

B24

PCT

WELT-ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHUNG
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Aktenzeichen:	PCT/EP95/000297	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:	WO 95/20652
(22) Internationales Anmeldedatum:	27. Januar 1995 (27.01.95)	(43) Internationale Veröffentlichungstdatum:	3. August 1995 (03.08.95)
(30) Prioritätsdaten:	P 44 02 569.5 23. Januar 1994 (23.01.94)	DE	Veröffentlichung

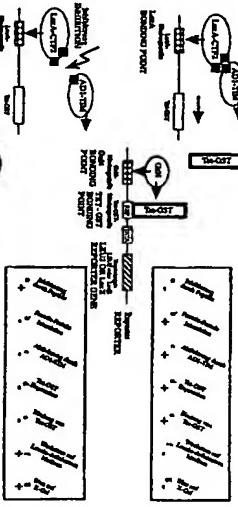
(71) Anmelder (für alle Benennungen außer USA; MEDICO GMBH (DE2)):	Lochmühler Straße 1a, D-8135 München München (DE).	(8) Bestimmungssätze:	AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, JP, KR, LT, LV, MK, NL, PL, RU, SK, TA, US, ehemalige Pflicht (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(72) Ansässiger und Brüder: ALTMANN, Heribert (DE2); Wolfgang (DE2); Rügnerstrasse 25, D-8137 München (DE).	Seminarstrasse 7, D-81210 Germany (DE). WENDLER,	(9) Veröffentlichungstdatum:	3. August 1995 (03.08.95)

(74) Anschrift: DIELL, Hermann O., Th., zw.; Fluggerstrasse 13,
D-80639 München (DE).

**(54) Titel: METHOD OF DETERMINING THE ACTIVITY OF A REGULATORY FACTOR, AND USE OF THE METHOD
(54) Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines regulativen Faktors sowie Verwendung dieses Verfahrens**

(57) Abstract
The invention concerns a method of determining the activity of a regulatory factor, this activity being detected by means of a reporter system. To this end, one may use a first and second regulatory factor and the one or more reporter systems. The active first regulatory factor affects the activity of expression of the second regulatory factor which affects, in turn, the reporter system. Following addition of an inhibitory component, the activation of the reporter system is detected by the interaction between the first and second regulatory factors.

Repression der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen
LexA-CATZ und ADI-TDV im Repressionsabhangigen Verfahren



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Veröffentlichungen.
Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlicht.

AT	04	GB	03	KR	02
Oesterreich	Anmeldung	Vereinigtes Königreich	Mazedonien	MTV	Malta
BR	05	GR	04	NE	Nauru
Bundesrepublik	Armenien	Griechenland	Norwegen	NL	Niederlande
BR	06	CH	05	NO	Norwegen
Bundes Republik	Belarus	Schweiz	Ungarn	NC	Nostandeshalt
BR	07	HU	Tschechische Republik	PL	Polen
Bundes	Bulgarien	Hungary	Ukraine	PT	Portugal
BR	08	IS	Irland	RO	Rumänien
Bundes	Bosnien	Iceland	Italien	RU	Russische Föderation
BR	09	JP	Japan	SD	Sudan
Bundes	Kroatien	Japan	Korea	SE	Schweden
CA	10	KG	Kirgisische Republik	SI	Slowenien
Canada	Zentral Afrikanische Republik	Kirgisien	Demokratische Volksrepubl. Korea	SK	Slowakei
CC	11	KP	Demokratische Volksrepubl. Korea	SL	Somalia
Comoros	Kongo	Korea	Kambodscha	SV	Somalia
CI	12	KZ	Kasachstan	SR	Serbien
Côte d'Ivoire	Kamerun	Kazachstan	Lettland	ST	Singapur
CI	13	LA	Lettland	TO	Tobago
China	Kenia	Liechtenstein	Lettland	TC	Tschad
CI	14	LU	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	15	LY	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	16	LV	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	17	LT	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	18	MD	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	19	MC	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	20	ME	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	21	MD	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	22	MG	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	23	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	24	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	25	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	26	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	27	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	28	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	29	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	30	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	31	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	32	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	33	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	34	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	35	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	36	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	37	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	38	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	39	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	40	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	41	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	42	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	43	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	44	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	45	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	46	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	47	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	48	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	49	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	50	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	51	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	52	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	53	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	54	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	55	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	56	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	57	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	58	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	59	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	60	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	61	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	62	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	63	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	64	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	65	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	66	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	67	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	68	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	69	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	70	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	71	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	72	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	73	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	74	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	75	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	76	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	77	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	78	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	79	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	80	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	81	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	82	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	83	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	84	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	85	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	86	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	87	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	88	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	89	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	90	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	91	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	92	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	93	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	94	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	95	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	96	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	97	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	98	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	99	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	100	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	101	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	102	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	103	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	104	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	105	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	106	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	107	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	108	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	109	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	110	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	111	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	112	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	113	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	114	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	115	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	116	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	117	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	118	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	119	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	120	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	121	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	122	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	123	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	124	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	125	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	126	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	127	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	128	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	129	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	130	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	131	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	132	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	133	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	134	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	135	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	136	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	137	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	138	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	139	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	140	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	141	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	142	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	143	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	144	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	145	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	146	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	147	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	148	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	149	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	150	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	151	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	152	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	153	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	154	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	155	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	156	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	157	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	158	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	159	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	160	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	161	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	162	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	163	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	164	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	165	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	166	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	167	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	168	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	169	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	170	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	171	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	172	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	173	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	174	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	175	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	176	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	177	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	178	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	179	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	180	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	181	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	182	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	183	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	184	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	185	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	186	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	187	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	188	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	189	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	190	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	191	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	192	MR	Lettland	TT	Tschad und Togo
CI	193	ML	Lettland	TR	Tschad und Togo
CI	194	MR	Lettland		

1

in Ref.

2

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines regulatorischen Faktors sowie Verwendung dieses Verfahrens

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von regulatorischen Faktoren, wobei diese Aktivität über die Aktivität eines Reportersystems nachweisbar ist.
- 10 In lebenden Zellen werden Stoffwechselleistungen entweder kontinuierlich oder aber nur in bestimmten Entwicklungsphasen bzw. auf Grund äußerer Signale hin erbracht. Bei der durch Hormone vermittelten Signalübertragung etwa werden die entsprechenden Signale über Wechselwirkungen zwischen Proteinen von der äußeren Zellmembran in das Zellinnere hinein transportiert um dort, beispielsweise im Zellkern, in eine Auflöschung zur Teilung umgesetzt zu werden. Werden diese Wechselwirkungen gestört, kann dies eine gesunde Zelle aus dem Gleichgewicht bringen und zu Wachstumsstörungen führen. So kann z.B. eine entartete Zelle zu einem Krebsgeschwür heranzwachsen und über die Bildung von Metastasen den todkringenden Tumor über den gesamten Körper verteilen. Auch Viren wie HIV (Human Immunodeficiency Virus) oder HPV (Human Papilloma Virus) greifen in die natürlichen Abläufe der Zelle ein und missbrauchen sie dazu, sich zu vervielfältigen um dann weitere Zellen zu infizieren.
- 15 Es ist offensichtlich, daß über solche Wechselwirkungen gezielt in das Geschehen einer Zelle eingegriffen werden kann, sofern die entsprechenden Proteine bekannt und einem einfachen Test zugänglich sind. In den vergangenen Jahren sind daran Tests entwickelt worden. Sie beruhen letztlich darauf, daß eine einfache biochemische Reaktion, die durch eine Prozreaktion nachweisbar und vieltausendfach gleichzeitig durchführbar ist, von einer solchen Wechselwirkung zwischen Proteinen abhängig gemacht wird. Sogenannte *in vivo* Assays lassen diese Wechselwirkungen z.B.
- 20 Die Transkription proteinkodierender Gene wird von einem Multiproteinkomplex bestehend aus Pol II und einer Reihe spezifischer und genereller Transkriptionsfaktoren initiiert. Eine Vielzahl dieser Faktoren ist in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert worden, wodurch man erste Einblicke in die Mechanismen der eukaryontischen Genexpression erhalten hat (Zawel et al., Curr. Opin. Cell. Biol. (1992) 4, S. 488-495; Cortes et al., Mol. Cell. Biol. (1992) 12, S. 413-421; Flores et al., J. Biol. Chem. (1992) 267, S. 2786-2793).
- 25 Neben der basalen Transkriptionsmaschinerie spielen vor allem die DNA bindenden Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der stimulierten Genexpression.
- 30 Die drei charakteristischen Merkmale von Transkriptionsaktivatoren, wie proto-Onkogene oder virale Transkriptionsfaktoren und Protein-Protein-Wechselwirkungen in Signalketten oder Multiproteinkomplexen, welche sie zu besonders geeigneten Targets für Untersuchungen machen, sind ihre hohe Diversität, ihre Spezifität sowie ihre mögliche Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. So sind z.B. mehr als 300 genspezifische Transkriptionsfaktoren bis heute beschrieben und es wird angenommen, daß ca. 3000 weitere derartige Faktoren vom menschlichen Genom kodiert werden. Ähnlich wie Rezeptoren an der Zelloberfläche gleicht praktisch kein Faktor und keine Protein-Protein Wechselwirkung genau der anderen. Jedes Protein bietet eine einzigartige Oberfläche und stellt dadurch ein einzigartiges Target dar.

Die DNA-bindende und die stimulierende Aktivität müssen jedoch nicht auf einer Polypeptidkette lokalisiert vorliegen (Weston et al., Cell (1989) 58, S. 85-93). Die Teilung dieser beiden Eigenschaften erlaubt zum Beispiel die Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen X und Y, wobei der DNA-bindende Teil auf einem Protein X lokalisiert transkriptionsaktive Teil auf einem Protein Y lokalisiert sind (Pielus et al., Nature (1989) 340, S. 245-246). Die spezifische Inhibition dieser Interaktion resultiert im Verlust der stimulierenden Aktivität dieses Elements.

Bisher sind Verfahren bekannt, um Inhibitoren nachzuweisen, welche die biologische Aktivität von Oncoproteinen hemmen (WO 92/15286). Diese Verfahren werden eingesetzt, um 15 inhibitorische Komponenten zu identifizieren und klassifizieren, indem die Fähigkeit einer solchen Komponente untersucht wird, die Expression von Reportergenen zu beeinflussen. Nach der vorgenannten PCR-Veröffentlichung werden zur Durchführung dieses Verfahrens Fusionsgene bereitgestellt, welche für Fusionsproteine codieren. Diese Fusionsproteine binden an eine Blindestelle auf der DNA, wobei diese DNA für die Reportergene codiert, und vermittelnd so die Expression des Reportergens. Wird die Expression des Reportergens untersucht, so ist eine Abnahme der Reportergen-Expression Indikativ für eine Komponente, welche die Aktivität der Fusionsproteine hemmt.

Der Nachweis von Inhibitoren erfolgt bei Anwendung der genannten Verfahren ausschließlich über eine Abnahme der Expression der betreffenden Reportergene, d.h. es handelt sich um einen Negativnachweis. Das bekannte Nachweissystem ist insoweit von Nachteil, da es gegebenenfalls die Empfindlichkeit eines Testsystems herabsetzt. Wird z.B. ein Reportergen prinzipiell nur schwach exprimiert, so sind nach Inhibitortrugabe und somit noch weiter abnehmender Expression häufig keine eindeutigen Aussagen möglich. Diese Nachteile

gehen darauf zurück, daß eine zugesetzte inhibitorische Komponente einen Transkriptionsfaktor hemmt, der die Expression von Reportergenen beeinflußt, d.h. es handelt sich um eine direkte funktionelle Verbindung von Inhibitor und Reportergen. Insbesondere ist eine fehlende Expression nach Inhibitortrugabe von Nachteil, da Versuchsdurchführungen häufig auf Selektion von Organismen beruhen, wie im folgenden kurz erläutert. Wird so z.B. das Wachstum von Zellen nach Inhibitortrugabe untersucht, wachsen gerade die zu untersuchenden gelämmten Zellen nicht und müssen über weitere Versuche nachgewiesen werden. Ein Screening vieler verschiedener potentieller Inhibitoren ist daher nicht möglich. Die fehlende Expression von Reportergenen nach Inhibitortrugabe kann darüber hinaus auch auf die Einflunahme weiterer Faktoren zurückzuführen sein, beispielsweise des Inhibitors auf Faktoren der Translations- und Replikationsmechanismen sowie des Zellzyklus. Somit ist der Wirkungsort des Inhibitors häufig nicht klar zu definieren, woraus eine mangelnde Spezifität der bisherigen Nachweissysteme resultiert.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die vorgenannten Nachteile nicht aufweist, das schnelle, eindeutige und spezifische Aussagen über Testergebnisse ermöglicht sowie die Empfindlichkeit von Testsystemen verbessert.

Die Erfindung löst diese Aufgabe durch das im unabdingbaren Patentanspruch 1 angegebene Verfahren und die Verwendung nach Patentanspruch 63. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen, Aspekte und Details des erfundungsgemäß Verfahrens sind in den abhängigen Patentansprüchen 2 bis 62 sowie 64 und 65, den Zeichnungen, Tabellen und den bevorzugten Ausführungsformen dargestellt. Die vorliegende Erfindung stellt ein wesentlich verbessertes Nachweissystem für die Aktivität eines regulatotischen Faktors zur Verfügung. Mit dem angegebenen

jedoch nicht auf einer Polypeptidkette lokalisiert vorliegen (Weston et al., Cell (1989) 58, S. 85-93). Die Teilung dieser beiden Eigenschaften erlaubt zum Beispiel die Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen X und Y, wobei der DNA-bindende Teil auf einem Protein X lokalisiert transkriptionsaktive Teil auf einem Protein Y lokalisiert sind (Pielus et al., Nature (1989) 340, S. 245-246). Die spezifische Inhibition dieser Interaktion resultiert im Verlust der stimulierenden Aktivität dieses Elements.

Bisher sind Verfahren bekannt, um Inhibitoren nachzuweisen, welche die biologische Aktivität von Oncoproteinen hemmen (WO 92/15286). Diese Verfahren werden eingesetzt, um 15 inhibitorische Komponenten zu identifizieren und klassifizieren, indem die Fähigkeit einer solchen Komponente untersucht wird, die Expression von Reportergenen zu beeinflussen. Nach der vorgenannten PCR-Veröffentlichung werden zur Durchführung dieses Verfahrens Fusionsgene bereitgestellt, welche für Fusionsproteine codieren. Diese Fusionsproteine binden an eine Blindestelle auf der DNA, wobei diese DNA für die Reportergene codiert, und vermittelnd so die Expression des Reportergens. Wird die Expression des Reportergens untersucht, so ist eine Abnahme der Reportergen-Expression Indikativ für eine Komponente, welche die Aktivität der Fusionsproteine hemmt.

Der Nachweis von Inhibitoren erfolgt bei Anwendung der genannten Verfahren ausschließlich über eine Abnahme der Expression der betreffenden Reportergene, d.h. es handelt sich um einen Negativnachweis. Das bekannte Nachweissystem ist insoweit von Nachteil, da es gegebenenfalls die Empfindlichkeit eines Testsystems herabsetzt. Wird z.B. ein Reportergen prinzipiell nur schwach exprimiert, so sind nach Inhibitortrugabe und somit noch weiter abnehmender Expression häufig keine eindeutigen Aussagen möglich. Diese Nachteile

jedoch nicht auf einer Polypeptidkette lokalisiert vorliegen (Weston et al., Cell (1989) 58, S. 85-93). Die Teilung dieser beiden Eigenschaften erlaubt zum Beispiel die Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen X und Y, wobei der DNA-bindende Teil auf einem Protein X lokalisiert transkriptionsaktive Teil auf einem Protein Y lokalisiert sind (Pielus et al., Nature (1989) 340, S. 245-246). Die spezifische Inhibition dieser Interaktion resultiert im Verlust der stimulierenden Aktivität dieses Elements.

Bisher sind Verfahren bekannt, um Inhibitoren nachzuweisen, welche die biologische Aktivität von Oncoproteinen hemmen (WO 92/15286). Diese Verfahren werden eingesetzt, um 15 inhibitorische Komponenten zu identifizieren und klassifizieren, indem die Fähigkeit einer solchen Komponente untersucht wird, die Expression von Reportergenen zu beeinflussen. Nach der vorgenannten PCR-Veröffentlichung werden zur Durchführung dieses Verfahrens Fusionsgene bereitgestellt, welche für Fusionsproteine codieren. Diese Fusionsproteine binden an eine Blindestelle auf der DNA, wobei diese DNA für die Reportergene codiert, und vermittelnd so die Expression des Reportergens. Wird die Expression des Reportergens untersucht, so ist eine Abnahme der Reportergen-Expression Indikativ für eine Komponente, welche die Aktivität der Fusionsproteine hemmt.

Der Nachweis von Inhibitoren erfolgt bei Anwendung der genannten Verfahren ausschließlich über eine Abnahme der Expression der betreffenden Reportergene, d.h. es handelt sich um einen Negativnachweis. Das bekannte Nachweissystem ist insoweit von Nachteil, da es gegebenenfalls die Empfindlichkeit eines Testsystems herabsetzt. Wird z.B. ein Reportergen prinzipiell nur schwach exprimiert, so sind nach Inhibitortrugabe und somit noch weiter abnehmender Expression häufig keine eindeutigen Aussagen möglich. Diese Nachteile

5

Verfahren kann auch im lebenden Organismus eine inhibitorische Komponente durch Expression bzw. verstärkte Expression eines Reportersystems nachgewiesen werden, ohne daß die Nachteile bekannter Verfahren auftreten.

5

Damit wird die Empfindlichkeit des Testsystems entscheidend erhöht und ermöglicht das Screenen von Inhibitorbibliotheken großer Komplexität (über 10^9 verschiedene Moleküle).

10

Hiermit wird ein neues Prinzip zum Screenen nach Inhibitoren und Chemikalien, die entsprechende Aktivitäten modifizieren, eingesetzt. Der Assay kann auch zur Identifizierung bislang unbekannter Wechselwirkungen verwendet werden.

15

Wesentlich für das erfindungsgemäße Verfahren ist das Bereitstellen mindestens eines zweiten regulatorischen Faktors. Das im folgenden beschriebene Verfahren wird bevorzugt in Wirtorganismen durchgeführt, wodurch jedoch nicht ausgeschlossen werden soll, entsprechende Verfahren auch außerhalb eines Organismus durchzuführen. Als Wirtorganismen werden Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, oder eukaryotische Zellen, insbesondere Hefen, eingesetzt. Besonders bevorzugt sind der Bakterienstamm Escherichia coli oder der Hefestamm Saccharomyces cerevisiae.

25

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden, wie vorstehend erwähnt, bevorzugt in einem Wirtorganismus, mindestens ein Reportersystem mit mindestens einer ersten Genanordnung, welche mindestens ein Reportergen aufweist, bereitgestellt. Die Expression der Reportergene dient als Nachweissystem.

Des Weiteren wird mindestens ein erster regulatorischer Faktor bzw. die entsprechende Genanordnung bereitgestellt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung beeinflußt der mindestens eine erste regulatorische Faktor einen oder mehrere zweite regulatorische Faktoren und nicht direkt die Aktivität des

6

Reportersystems, wodurch es erstmais ermöglicht wird, die Aktivität eines ersten regulatorischen Faktors durch ein positives Signal nachzuweisen.

5

Der mindestens eine zweite regulatorische Faktor wird durch mindestens eine zweite Genanordnung codiert. Aus Gründen der Vereinfachung wird bei den bereits erwähnten und den in folgenden genannten, am Verfahren beteiligten Komponenten nicht immer ausdrücklich erwähnt, daß sowohl eine als auch mehrere Komponenten wie Gene, Genanordnungen, regulatorische Faktoren, Proteine usw., beteiligt sein können. Es soll jedoch so ausgelegt werden, daß diese Möglichkeiten eingeschlossen sind. Bevorzugt wird die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors durch den ersten regulatorischen Faktor beeinflußt. Über eine Wechselwirkung des zweiten regulatorischen Faktors mit Komponenten des Reportersystems wird auch Einfluß auf die Aktivität des Reportersystems genommen. Somit wird gemäß der vorliegenden Erfindung die Aktivierung des Reportersystems durch Zugabe einer inhibitorischen Komponente über das Zusammenwirken der ersten und zweiten regulatorischen Faktoren nachgewiesen.

15

Der erste regulatorische Faktor enthält eine oder mehrere regulierende Komponenten. Enthält der erste regulatorische Faktor mehrere regulierende Komponenten, ist insbesondere die zusammenge setzte Form die aktive Form. Bei den ein oder mehreren regulierenden Komponenten handelt es sich häufig um ein oder mehrere regulierende Proteine. Die regulierenden Proteine sind bevorzugt ein oder mehrere Transkriptionsregulatoren, beispielweise Transkriptionsfaktoren. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Transkriptionsfaktor nur ein Protein.

25

Gemäß einer weiteren, bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält der der Transkriptionsregulator mindestens zwei Hybridproteine,

1

Insbesondere zwei Hybridproteine, welche von einer bereitgestellten dritten Genanordnung codiert werden. Die Hybridproteine sind bevorzugt ein erstes Hybridprotein, welches ein Fusionsprotein aus einer DNA-Bindddomäne und einer ersten Proteinkomponente ist, und ein zweites Hybridprotein, welches ein Fusionsprotein aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist. Durch Bindung zwischen den beiden Proteinkomponenten, die auch Targets genannt werden, entsteht der aktive Transkriptionsregulator.

15 Die regulierenden Komponenten der ersten regulatorischen Faktors sind gemäß dem vorliegenden Verfahren nicht auf regulierende Proteine beschränkt. So kann beispielsweise der erste regulatorische Faktor Nukleinsäuren oder auch weitere Komponenten enthalten.

25 20 Die Aktivität des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors wird durch inhibitorische Komponenten beeinflußt. Diese inhibitorischen Komponenten sind bevorzugt Naturstoffe wie Peptide, Nucleinsäuren und Kohlenhydrate oder niedermolekulare Substanzen oder andere chemische Substanzen oder auch durch Mutagenese veränderte Bestandteile des ersten regulatorischen Faktors.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine vierte Genanordnung für die Expression von Peptiden bereitgestellt. Diese Peptide weisen insbesondere eine inhibitorische Aktivität auf. So können in vivo synthetisierte Peptidlibraries zur Inhibition von regulatorischen Faktoren eingesetzt werden. In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen werden beliebige Kombinationen der genannten Inhibitoren zugesetzt.

5 Besonders wichtig ist die Einwirkung der inhibitorischen Komponenten auf die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors durch Einwirkung auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei regulatorischen Komponenten, die in dem ersten regulatorischen Faktor enthalten sind. Diese Einwirkung ist bevorzugt eine Hemmung der Wechselwirkung der regulatorischen Komponenten. Die Aktivität kann auch aufgrund mehrerer Komponenten, z.B. in einem Multiproteinkomplex, reguliert werden. Dieser Komplex ist solange aktiv, wie einzelne oder mehrere Bausteine diesen Komplex bilden. Erst die Inhibition einer oder mehrerer dieser Komponenten zerstört die Aktivität des gesamten Komplexes. Auch vom bisher beschriebenen abweichende Aktivitäten, die in irgendeiner Weise die Expression des zweiten regulatorischen Faktors aktivieren, sind als erster regulatorischer Faktor geeignet. Die Inhibition des ersten regulatorischen Faktors kann sowohl die Aktivität des Transkriptionsregulators und/oder die Generierung des Transkriptionsregulators betreffen. Insbesondere wird die Wechselwirkung zwischen zwei regulierenden Proteinen des ersten regulatorischen Faktors gehemmt. Wird eine der genannten Wechselwirkungen gehemmt, liegt ein inaktiver oder in seiner Aktivität herabgesetzter erster regulatorischer Faktor vor. Infolgedessen ist die Interaktion des ersten regulatorischen Faktors mit dem zweiten regulatorischen Faktor gehemmt oder herabgesetzt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Wechselwirkung zwischen dem ersten regulatorischen Faktor und dem zweiten regulatorischen Faktor beeinflusst. Auch diese Einwirkung ist besonders bevorzugt eine Hemmung. In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform beeinflusst der Inhibitor die Wechselwirkung des ersten regulatorischen Faktors mit Gabschnitten der zweiten Genanordnung. In einer weiteren Ausgestaltung des erfundungsgemäßen Verfahrens modifiziert der mindestens eine erste regulatorische Faktor, der bevorzugt ein oder mehrere Proteine enthält, den mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor,

beispielsweise über Kinasierung, Deposphorylierung, Spaltung, Umfaltung oder Konformationsänderung.

Wird kein Inhibitor zugesetzt, liegt der erste regulatorische Faktor insbesondere in der aktiven Form vor und wirkt auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors ein. Es ist des

wesentlichen bevorzugt, daß der erste regulatorische Faktor mit

DNA-Abschnitten der für den zweiten regulatorischen Faktor codierenden zweiten Genanordnung wechselwirkt und somit die Expression des zweiten regulatorischen Faktors beeinflußt.

Die Zugabe einer inhibitorischen Komponente beeinflußt beispielsweise die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten, welche gemeinsam den ersten regulatorischen Faktor bilden. In einer weiteren Ausführungsform wirkt die

Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors ein, unabhängig davon, ob er eine oder mehrere regulierende Komponenten enthält. Die Einwirkung auf die Aktivität betrifft beispielsweise die transkriptionsaktivierende oder bindende Aktivität des ersten regulatorischen Faktors oder die Interaktion des ersten und zweiten regulatorischen Faktors.

In einer weiteren Ausführungsform beeinflußt die Zugabe einer inhibitorischen Komponente sowohl die genannte Wechselwirkung als auch die genannte Aktivität. Die Einwirkung ist bevorzugt eine Hemmung der Wechselwirkung und/oder der Aktivität.

Durch Zugabe der inhibitorischen Komponente wird bevorzugt die Wechselwirkung zwischen dem ersten regulatorischen Faktor und einem DNA-Abschnitt der zweiten Genanordnung, welche den zweiten regulatorischen Faktor codiert, wobei es sich insbesondere um eine Hemmung handelt, beeinflußt. Die Einwirkung bzw. die Hemmung der oben genannten Wechselwirkungen durch inhibitorische Komponenten führt zu einer Einwirkung auf die Genexpression der zweiten

Genanordnung, insbesondere zu einer Hemmung der Genexpression der zweiten Genanordnung. Besonders bevorzugt führt die Zugabe der inhibitorischen Komponente über eine Hemmung der Aktivität des regulierenden Proteins zu einer Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfundungsgemäßen Verfahrens wird durch die Zugabe einer inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten eingewirkt, wobei eine dieser

Komponenten eine regulatorische Komponente ist oder eine regulatorische Komponente enthält.

Vorteilhaft ist, wenn diese regulatorische Komponente eine Proteinkomponente ist oder mindestens eine Proteinkomponente erhält. Bevorzugt sind bei den Proteinkomponenten Fusionsproteine.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist die regulatorische Komponente eine inhibitorische Komponente. Die mindestens eine zweite Komponente ist beispielsweise eine Proteinkomponente oder enthält eine Proteinkomponente. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß diese Proteinkomponente ein Fusionsprotein ist.

Bei den zweiten Proteinkomponenten handelt es sich insbesondere um Proteinkomponenten, die Verankerungsfunktionen besitzen. Bevorzugt erfolgt die Verankerung der miteinander wechselwirkenden Proteinkomponenten im Cytoplasma. Als vorteilhaft hat sich auch die Verankerung der miteinander in Wechselwirkung stehenden Proteine über die Verankerungsfunktion der zweiten Proteinkomponente in der Membran erwiesen.

11

12

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform erfolgt über die Zugabe einer inhibitorischen Komponente eine Hemmung der Wechselwirkung zwischen den mindestens zwei Komponenten, die Freisetzung der mindestens einen ersten Komponente, welche den inhibitorisch wirkamen Abschnitt entfällt. Diese freigesetzte erste Komponente interagiert mit dem transkriptionsaktivierenden Faktor der Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor. Besonders bevorzugt wird der transkriptionsaktivierende Faktor durch den freigesetzten inhibitorisch wirkenden Faktor gehemmt, wodurch eine Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung erfolgt.

In den bisher und auch im folgenden genannten Ausführungsformen enthalten die regulatorischen bzw. interagierenden Komponenten Abschnitte, die die regulatorische bzw. interagierende Funktionen bedingen. Die entsprechenden Proteineabschnitte können eine oder mehrere Abschnitte oder Domänen beinhalten. Diese Abschnitte oder Domänen können sich in verschiedenen Regionen eines Proteins bzw. auf verschiedenen Proteinen befinden.

Vorzugsweise werden die mindestens zwei Proteinkomponenten von einer fünften Genanordnung codiert.

Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente einen Abschnitt, der mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente wechselwirkt, einen Abschnitt, der mit einem Transkriptionsfaktor wechselwirkt sowie einen inhibitorischen Abschnitt enthält, wobei erst nach Hemmung der Wechselwirkung der Bindung zwischen den mindestens zwei Proteinkomponenten die inhibitorisch wirkende zweite Proteinkomponente die Expression des zweiten regulatorischen Faktors hemmt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist die mindestens eine erste regulatorische Komponente ein

Transkriptionsregulator oder Transkriptionsfaktor des zweiten regulatorischen Faktors, der nach Inhibition der Wechselwirkung mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente in seiner Aktivität reduziert oder inaktiviert wird, wodurch eine Inhibition oder Reduzierung der Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors erfolgt.

Bei den zweiten regulatorischen Faktoren handelt es sich insbesondere um Proteine, beispielsweise, je nach Versuchsanordnung, um mindestens einen Repressor oder um mindestens eine Rekombinase. Die aktiven zweiten Komponenten des Reportersystems auf die Aktivität des regulatatorischen Faktoren wirken über eine Wechselwirkung mit Reportersystems ein. Der zweite regulatorische Faktor bindet bevorzugt an DNA-Abschnitte des Reportersystems.

Ein Repressor, codiert durch die zweite Genanordnung, ist ein Beispiel für einen zweiten regulatorischen Faktor. Dieser Repressor beeinflußt die Expression mindestens eines Reportergens, indem er bevorzugt an Komponenten des Reportersystems bindet. Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung des erfundungsgemäß Verfahrens wird die Bindung des Repressors an Komponenten des Reportersystems durch weitere Agenzen reguliert. So induziert beispielsweise das Antibiotikum Tetracyklin eine Ablösung eines prokaryotischen Repressors von der DNA. Ein aktiver Repressor hemmt die Expression mindestens eines Reportergens. Wird dagegen, zum Beispiel durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression des Repressorgens gehemmt, erfolgt die Expression mindestens eines Reportergens.

Eine Rekombinase, codiert durch die zweite Genanordnung, ist ein weiteres Beispiel für einen zweiten regulatorischen Faktor. In einer entsprechenden Versuchsanordnung enthalten die Reportersysteme Rekombinationselemente. Liegt ein aktiver

1

卷之三

die Rekombinase über Rekombinationsprozesse mindestens einen Reporteren. Hierbei interagiert die Rekombinase mit den spezifischen, das Reportergen bzw. die Reportergene flankierende Promotoren.

invertiert das Reportagen, welches von den

10 Rekombinationselementen flankiert wird. Sowohl nach einer Elimination als auch nach Invertierung wird das Reportergen nicht exprimiert. Ist also kein Inhibitor dem Versuchsaufbau zugesetzt worden, liegt ein aktiver erster regulatorischer

Faktor vor, der bevorzugt die für einen zweiten regulatorischen Faktor consideranten Güte-

insbesondere über Wechselwirkung mit DNA-Schmittgruppen aktiviert, zweite aktive Faktor, wie z.B. ein Repressor oder eine

Rekombinase, heutige die Expression der Reportergene.

Durch die Beeinflussung der Wechselwirkung von mindestens zwei regulatorischen Komponenten des Transkriptionsregulators, wobei die regulatorischen Komponenten insbesondere zwei Hybirdproteine sind, wird in

einer bevorzugten Ausgestaltung des erfundungsgemäßen Verfahrens die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert werden.

„... kann dann eine Veränderung der Expression mindestens eines Reporterogens erfolgt. Durch Hemmung der Wechselwirkung des „Wortes“ auf den Reporterogen kann die Expression dieses Genes verhindert werden.“

bei myboproteinen des Transkriptionsregulators (bzw. anderer regulatorischer Faktoren des Transkriptionsregulators) wird die Expression der Rekombinase Transkriptionsregulators

erfolgt eine Expression des mindestens einen Reportergangs.

Besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform, bei der durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei

proteinkomponenten die Expression mindestens eines Repressor-
gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression
des mindes...
tens...
tens...

und wenn es einen Reportergang erfolgt.

14

5

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression des Repressor-Gens gehemmt und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

10 Besonders bevorzugt wird durch Hemmung der Wachselwirkung der Proteinkomponenten die Expression der Rekombinase gehemmt und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

15 Die Versuche basieren darauf, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen mindestens ein Genprodukt des mindestens einen Reportergens nachweisbar ist.

20 Gemäß bevorzugter Ausführungsformen wird ein Genprodukt eines Reportergens oder werden mehrere Genprodukte mehrerer Reportergene exprimiert. In einer weiteren Ausgestaltung werden je nach variierenden Versuchsbedingungen ein bis mehrere Reportergene exprimiert.

25 Der Nachweis des Genprodukts bzw. der Genprodukte erfolgt dann beispielsweise über eine oder mehrere Veränderungen des Phänotyps von Wirtszellen. In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das Genprodukt des Reportergens Zellwachstum der Wirtszellen in Mangeldmedium. Das Genprodukt z.B. des Reportergens Leu2 ermöglicht Zellwachstum in Leucindefizientem Medium. Bei einer weiteren vorteilhaften Abwandlung des erfundungsgemäßen Verfahrens werden Hefestämme mit chromosomal Mutationen als Wirtszellen eingesetzt, die beispielweise zu Leucin-Defizienzen bei der Verstoffwechelung der Aminosäure Leucin führen. Die

30

35

chromosomalen Mutationen können auch zu Defizienzen bei der Verstoffwechselung der Aminosäuren Tryptophan und Histidin führen. Gegebenenfalls ist auch der Einsatz proteasedefizienter Hefen sinnvoll.

Es ist auch bevorzugt, Genanordnungen bereitzustellen, die für ein oder mehrere Genprodukte codieren, wobei diese Genprodukte Substrate in einer messbaren Farbreaktion umsetzen können, wie z.B. das Reportersystem LacZ. Das Genprodukt dieses Reportergens, die β -Galactosidase, reagiert mit verschiedenen Substraten in einer sichtbaren Farbreaktion.

Die für das vorliegende Verfahren genannten Genanordnungen können auf verschiedenen Vektoren oder denselben Vektor angeordnet sein. Als Vektoren werden insbesondere Plasmide verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsfom sind ein oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Genanordnungen, oder eine oder mehrere Genanordnungen, ins Wirtsgenom integriert.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird also durch Einsatz einer oder mehrerer inhibitorischer Komponenten zunächst die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors beeinflusst, wobei dieser wiederum auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors einwirkt.

Der zweite regulatorische Faktor wirkt schließlich auf die Expression des Reportergens ein. Bevorzugt wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch Zusatz ein oder mehrerer inhibitorischer Komponenten die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors gehemmt, dadurch bedingt wird ebenfalls der zweite regulatorische Faktor gehemmt, wobei gemäß einer bevorzugten Ausführungsfom der zweite regulatorische Faktor selbst gehemmt oder in einer weiteren bevorzugten Ausführungsfom die Expression des zweiten regulatorischen Faktors gehemmt wird. Da in keinem Fall ein

aktiver zweiter regulatorischer Faktor vorliegt, wird das Reportergen bzw. werden die Reportergene exprimiert. Erst die Inhibition des ersten regulatorischen Faktors bewirkt also eine Expression von Reportergenen. Der jeweilige Phänotyp hängt davon ab, ob der zweite regulatorische Faktor gebildet wird oder nicht. Besonders hervorgehoben werden soll eine weitere Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, wobei in einem Wirtszorganismus zwei Genanordnungen für zwei zweite regulatorische Faktoren, insbesondere Genanordnungen für einen Repressor und eine Rekombinase, neben den in z.B. Anspruch 1 erwähnten übrigen zur Versuchsdurchführung notwendigen Genanordnungen, bereitgestellt werden.

Je nach Versuchsbedingung wird einer der beiden zweiten

regulatorischen Faktoren, d.h. insbesondere Repressor oder Rekombinase, oder werden auch beide gleichzeitig exprimiert. Hierdurch bedingt wird eine erhöhte Spezifität des Verfahrens erreicht.

Die Inhibition der Aktivität des Transkriptionsfaktors bzw. des Transkriptionsregulators oder dessen Generierung führt schließlich zur Aktivierung des Reportergens bzw. der Reportergene.

Gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist es möglich, hochspezifische Inhibitoren nachzuweisen, sowie Selektivität und Spezifität des Nachweises von Inhibitoren zu erhöhen. Mit dem vorliegenden Verfahren sind so z.B. bei Wachstumsversuchen selektiv die Zellen nachweisbar, auf die der Inhibitor eingewirkt hat, während die "nicht gehemmten" Zellen nicht wachsen, d.h. es ergeben sich keine Probleme wie Überwachsen der interessierenden Zellen. Damit wird die Empfindlichkeit des Testsystems entscheidend erhöht und ermöglicht das Screening von Inhibitorbibliotheken großer Komplexität (über 10⁹ verschiedene Moleküle). Somit ist es mit dem erfundungsgemäß Verfahren überhaupt zum ersten Mal

17

18

18

möglich, nach Inhibitorzugabe eine Identifikation von Zellen, insbesondere auch aufgrund von Wachstum, durchzuführen. Dies erweist sich als sehr vorteilhaft, wenn z.B. ein sehr ungünstiges Verhältnis von Zellen, auf die der Inhibitor einwirkt (meist sehr geringer Anteil), zu Zellen, auf die der Inhibitor nicht einwirkt, vorliegt. Des Weiteren ist es möglich, Aussagen bezüglich des spezifischen Wirkungsortes des Inhibitors zu machen, da gezielt auf z.B. regulatorische Faktoren eingewirkt wird und erst nach Hemmung des Faktors die Reportergene exprimiert werden. So ermöglicht das Verfahren, Signalketten und andere Regulationsmechanismen zu untersuchen und bietet Voraussetzungen für eine spezifische Arzneimittelerstellung. Das Verfahren dient zur Auffindung von Leiststrukturen, die bevorzugt zur Entwicklung von Therapeutika eingesetzt werden. Das weitere wird das Verfahren bevorzugt zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die beispielsweise als Leiststrukturen einsetzbar sind, verwendet. Diese inhibierenden Substanzen sind beispielsweise Peptide, Naturstoffe und synthetische Chemikalien. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Inhibition des ersten regulatorischen Faktors in vivo synthetisierte Peptidlibraries bereitgestellt.

Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt, wobei die Ausführung jeweils unter Berücksichtigung eines aktiven bzw. inaktiven ersten regulatorischen Faktors erläutert wird. Ausgegangen wird bei den Ausführungen von Proteinen als regulatorische Faktoren.

Gelbfärbung). Entsprechend analog zu *lacZ* können auch andere Gene, welche Enzyme aus der Biosynthese codieren, wie z.B. das Gen *URA3*, eingesetzt werden, da seine Expression entsprechend defiziente Restaktivität komplementieren und damit Wachstum auf Uracil defizienten Medien ermöglichen kann (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, International Yeast Genetics, (1986)). Auch die Aktivität von Luciferase oder Chloramphenicol-Acetyltransferase kann leicht und schnell in enzymatischen Reaktionen nachgewiesen werden (Ibelgauft, Gentechnologie von A bis Z (1990) VCH-Verlag (Weinheim)).

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der beiliegenden Zeichnungen näher erläutert.

Fig. 1a und 1b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 1a) und eines inaktiven (Fig. 1b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 2a und 2b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 2a) und eines inaktiven (Fig. 2b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

Als Reportergen dienen z.B. das *lacZ*-Gen, welches Wachstum auf Lactose-defizientem Medium ermöglicht, und das *lacZ*-Gen, dessen Genprodukt, die β -Galactosidase, verschiedene Substrate in einer sichtbaren Farbreaktion umsetzt (*X-Gal* (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) ergibt Blaufärbung, ONPG (o-Nitro-phenyl-galactopyranosid) ergibt

19

Fig. 9a und 9b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 4a) und eines inaktiven (Fig. 4b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 5a und 5b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 5a) und eines inaktiven (Fig. 5b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 6a und 6b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 6a) und eines inaktiven (Fig. 6b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 7a und 7b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 7a) und eines inaktiven (Fig. 7b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 8a und 8b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 8a) und eines inaktiven (Fig. 8b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

20

Fig. 10a und 10b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 10a) und eines inaktiven (Fig. 10b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CFP mit der DNA dargestellt wird.

Fig. 11a und 11b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 11a) und eines inaktiven (Fig. 11b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2 - ADI-TIM mit der DNA dargestellt ist.

Bei den in den Fig. 1 und 3 genannten Targets (zielen) bzw. transkriptionsstimulierenden Targets handelt es sich um regulatorische Faktoren, insbesondere um Transkriptionsfaktoren für die Expression der zweiten regulatorischen Faktoren, auf die der Inhibitor einwirkt. Die regulatorischen Faktoren sind in den in den Figuren gezeigten Beispielen ein Repressor bzw. eine Rekombinase.

Bei den in den Fig. 2 und 4 genannten Targets (zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden regulatorischen Komponenten des regulatorischen Faktors, wobei Target I die regulatorische Komponente mit der

20

Fig. 9a und 9b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor LexA-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 9a) und eines inaktiven (Fig. 9b) ersten regulatorischen Faktors ADI-Tet mit der DNA dargestellt wird.

Fig. 10a und 10b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 10a) und eines inaktiven (Fig. 10b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CFP mit der DNA dargestellt wird.

Fig. 11a und 11b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 11a) und eines inaktiven (Fig. 11b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2 - ADI-TIM mit der DNA dargestellt ist.

Bei den in den Fig. 1 und 3 genannten Targets (zielen) bzw. transkriptionsstimulierenden Targets handelt es sich um regulatorische Faktoren, insbesondere um Transkriptionsfaktoren für die Expression der zweiten regulatorischen Faktoren, auf die der Inhibitor einwirkt. Die regulatorischen Faktoren sind in den in den Figuren gezeigten Beispielen ein Repressor bzw. eine Rekombinase.

Bei den in den Fig. 2 und 4 genannten Targets (zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden regulatorischen Komponenten des regulatorischen Faktors, wobei Target I die regulatorische Komponente mit der

21

22

22

bindenden Aktivität und Target II die regulatorische Komponente mit der transkriptionsaktivierenden Aktivität ist.

Bei den in den Fig. 5 und 6 genannten Targets (zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden Komponenten des ersten regulatorischen Faktors, wobei Target I die regulatorische Komponente mit sowohl der DNA bindenden als auch der transkriptionsaktivierenden Aktivität und Target II die Komponente ist, mit der Target I wechselwirkt und ausschließlich bei ungestörter Wechselwirkung in der aktiven Form vorliegt.

Bei den in den Fig. 7 und 8 genannten Targets (zielen) handelt es sich um miteinander interagierende Komponenten, wobei Target II die regulatorische Komponente mit sowohl einer inhibierenden Aktivität als auch einer bindenden Aktivität, und Target III eine verankerte Komponente ist.

Die bindende Aktivität des Target II bezieht sich auf die Wechselwirkung des von Target III gelösten Targets II mit der X-Komponente von Target I. Die X-Komponente von Target I wiederum ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor des zweiten regulatorischen Faktors.

Mit der Bezeichnung Aktivität werden insbesondere Proteinabschnitte bezeichnet, die die jeweilige Aktivität bzw. die betreffende Funktion bewirken. Hierbei können eine oder mehrere Domänen betroffen sein. Die Domänen bzw. Proteinabschnitte können in verschiedenen Bereichen eines Proteins oder auf verschiedenen Proteinen lokalisiert sein. Entsprechend sind die Bindestellen dieser Faktoren als Target-Bindestellen bezeichnet.

In den Beispielen 1 bis 11 wurde wie folgt vorgegangen:

Hefe-Plasmide

Zur Expression der verschiedenen Gene in den zugrundeliegenden Assay werden sowohl kommerziell erhältliche Plasmide (z.B. pYES2 der Firma Invitrogen, Niederlande), als auch andere Konstrukte (Altmann, H. Dissertation (1994), Altmann H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1994) 91, S. 3901-3905) eingesetzt. Normalerweise besitzen diese Plasmide einen Replikationsursprungsort zur Vervielfältigung ihrer DNA in Hefen (z.B. "2μm ori") sowie einen zur Replikation in Bakterien (z.B. "colE1 ori"). Des Weiteren werden Markergene zur Selektion dieser Plasmide in den beiden Organismen verwendet (z.B. URA3, HIS3, TRP1 oder LEU2 in Hefe sowie Ampr oder TetR in E. coli) (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986); Inselraut, Gentechnologie von A bis Z (1990) VCH-Verlag (Weinheim)). Beispiele für Hefekonstrukte sind beschrieben (Winnacker et al., From Genes to Clones (1987). VCH-Verlag (Weinheim); The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces (1991) Vol. 1 und 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Die Expression von Genen kann über konstitutive (z.B. ADH1-Promotor), induzierbare (z.B. Gal4-promotor) oder eigens konstruierte Target-abhängige Promotoren (NPI, Tet, LexA) erfolgen.

Anstelle in Plasmide kloniert können die einzelnen Elemente des Assays auch in das Genom des verwendeten Hefestamms integriert werden (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986)). Darunter in der Hefe lokalisierte Elemente benötigen keinen eigenen Replikationsursprungsort sowie Selektionsmarker.

Folgende Elemente werden im Testsystem verwendet:

a) Promotoren:

ADH-Promoter: Dieser konstitutiv exprimierende Promotor wird über die Restriktion mit den Enzymen BamHI und HindIII funktionell aus dem Plasmid pAAB5 isoliert (Aumerer et al., Methods in Enzymology (1983), Academic Press, S. 192-201).

Gall-Promoter: Dieser auf Glukose-haltigen Medien reprimierbare und auf Galaktose-haltigen Medien induzierbare Promotor wird mit Hilfe des Restriktionsenzymes SpeI aus dem Vektor pYES2 der Firma Invitrogen (Niederlande) isoliert.

Inaktiver Gall/Gal4-Promoter: Dieser ursprünglich über Galaktose induzierbare Promotor wird auf Sequenzebene daran deletiert, daß er in Hefe nur mehr basale Aktivität besitzt (Yocum et al., Mol. Cell. Biol. (1984)

4, S. 1985-1998; West et al., Mol. Cell. Biol. (1984) 4, 20 2667-2478). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI und HindIII wird dieses Promotorelement aus dem so konstruierten Vektor plakal isoliert und für weitere Zwecke verwendet.

NFI-abhängiger Promoter: Die von Meisterernst et al.

(Nucl. Acid Res. (1988) 236, S. 27-32) gefundene Konsensussequenz als DNA-Bindungsstelle für Mitglieder der NFI-Familie (Nuklear Faktor I) wird als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von NFI-abhängigen Promotoren verwendet (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, S. 3901-3905).

Sequenz für 6 NFI-Bindestellen konstruiert aus zwei Oligonukleotiden:

1. Oligo:

5'- TGG AGT TTT TGG CAC TGT GCC AAC TCT TTT TGG CAC TGT GCC AAC TCT
3' - CA AAA ACC GTG ACA CGG TTA AGA AAA ACC GTG ACA CGG TTA AGA
TTT TGG CAC TGT GCC AAC TCT - 3'
AAA ACC GTG ACA CGG TTA AG - 5'

2. Oligo:

5'- TTT TGG GCA CTG TGC CAA TTC TTT TGG GCA CTG TGC CAA TTC TTT TGG
3' - AAA AAC CCT GAC AGC GTT AAG AAA AAC CCT GAC AGC GTT AAG AAA AAC
GCA CTG TGC CAA TTC - 3'
CGT GAC ACG GTT AGC AGC T - 5'

Tet-abhängiger Promoter: Die von Hillen et al. (Nature (1982) 297, S. 700-702) gefundene Konsensussequenz als DNA-Bindungsstelle für den Tet-Repressor wird als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von Tet-abhängigen Promotoren verwendet.

Sequenz für die Tet-Operator-Bindstelle O₁/O₂:

20 5'- TGG ATC TCT ATC ACT GAT AGG GAG TGG TAA ATT AAC TCT ATC ATT GAT
3' - AG AGA TAG TGA CTA TCC CTC ACC ATT TTA TGG AGA TAG TTA CTA
AGA - 3'
TCT CAG A- 5'

LexA-abhängiger Promoter: Die DNA-Konsensussequenz als

Bindungsstelle für den bakteriellen Repressor LexA wurde als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von LexA-abhängigen Promotoren verwendet (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, S. 3901-3905; Wendler et al., Nucl. Acid Res. (1994) 22, S. 2601-2603; Brent et al., Cell (1985) 43, S. 729-736). Um die reprimierende Aktivität von LexA-fusionen auf den Galaktose-induzierten Gall-Promotor nachzuweisen, wird mit Hilfe des Restriktionsenzymes BamHI dieser Promotor aus dem Plasmid JK101 (Golemis et al., Mol. Cell. Biol.

15
5
10
15
20
25
30
35

(1992) 12, S. 3006-3014) isoliert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

loxP-abhängiger Promoter: Die von Hoess et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, S. 3398-3402) beschriebenen loxP-Elemente, welche es der Rekombinase Cre des Coliphagen P1 ermöglichen zwischen zwei derartigen Elementen liegende Sequenzen zu deletieren oder zu invertieren werden als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von Cre-abhängigen Promotoren verwendet.

Sequenz für das loxP-Rekombinase Element:

15 5'-GAG ANC ATA TTC ATT AAC CCT TAA TAT AAC TTC GAA TAA TGT ATG CTA

3'-CTC TAG TAT AAG TTA TTG GCA ATT ATA TTG AGG CAT ATT ACA TAC GAT
TAC GAA GTT ATT AGG TCG - 3'

ATG CTT CTA TAA TCC AGC AGC T - 5'

20 b) Reportergene.

LacZ-Gen: Das LacZ-Gen wird über die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII aus dem Plasmid pMC171 (Casadaban et al., J. Meth. in Enzy. 100, (1983) 100, S. 293-308) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

lacZ-Gen: Das lacZ-Gen wird über die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII aus dem Plasmid pMC171 (Casadaban et al., J. Meth. in Enzy. 100, (1983) 100, S. 293-308) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

25 30

eingesetzte Sequenzprimer:

CreI: 5'-GGG GTA CCT ATG TCC ATT TTA CTG AC - 3'

CreRev: 5'-GGG GTA CGG CGG CCT ATT CGC CAT CTT CC - 3'

c) Targetgene

NFL-Gene: Die verschiedenen NFL-Gene werden kloniert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt (Meisterernst et al., Nuc. Acid Res. (1998) 236, S. 27-32; Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

LexA-Gen: Das LexA-Gen wird mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI aus dem Plasmid pEGC02, einem Derivat des Vektors LexA202 mit einer zusätzlichen Polylinkersequenz hinter dem LexA-Gen (Ruden et al., Nature (1991) 350, S. 250-252) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

30 35

NEKR-Gen: Die codierende Sequenz für die transkriptionsaktive Domäne TFI (Aminosäure 521-551) des Proteins NEKR wird mit Hilfe des Restriktionsenzymes EcoRI aus dem Plasmid pLEXTFI (Schmitz et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, S. 25613-25620) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

LeuI: 5'-GGC GGA TCC ATG TCT GCC CCT ATG - 3'

LeuRv: 5'-GCT CTA GAT CTT TTG AAG CAA GCA TTT TC - 3'

Sequenz:

5' - TAG CCG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AGA GCT CTT CGG TCT GCC TAG CWN
 BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BAG CGC TGG TCC GAA GAG CTC
 TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA .-3'

TIM-Gen: Die codierende Sequenz für den C-terminalen Teil des TIM-Proteins wird mit CTF2, einem Mitglied der NPL-Familie, im sog. "interaction trap" (Current Protocols in Molecular Biology, 1994; Altmann (1994) Dissertation) isoliert.

GSP-Gen: Die kodierende DNA-Sequenz für die 26 kDa-Domäne aus dem GST Protein (Glutathion-S-Transferase) wird

10 mittels Restriktionsenzymen aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pGEX 3X der Firma Pharmacia (Schweden) isoliert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

15 **ADL-Gen:** Das Fusionogen ADL-Tet setzt sich aus der sauren Aktivierungsdomäne ADL, isoliert aus dem Plasmid pJG4-5 (Guris et al., Cell (1983) 75, S. 791-803) mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI, und der kodierenden Sequenz für den Tet-Repressor (siehe oben) zusammen.

20 **d)** **Inhibitorexpression:**

Die Kultivierung und Transformation von Bakterien, Hefen und höheren eukaryontischen Zellen erfolgt nach Standardbedingungen (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987), John Wiley & Sons (New York); Miller, Experiments in Molecular Genetics (1972), Cold Spring

Harbour, N.Y.; Sambrook et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbour Laboratory Press; Lindl et al., (1987); Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

30 **Trk1:** 5' - GGA ATT CCC CGG GAT GAG CGA TAA ATT TAT TC - 3'
 Trkrev: 5' - CGG GAT CCC TCG AGT CAG CTA ATT ACC CGG GTA CCA CTG G -3'

35 **"Random Oligo-Pool":** Zur Konstruktion eines "Random Oligo-Pools" wird ein Einzelstrangoligonukleotid-Pool folgender Zusammensetzung synthetisiert:

Die Bakterienstämme JK101 der Firma Stratagene (Deutschland) und Top10 der Firma Invitrogen (Deutschland), sowie die Hefestämme INVSc1 und INVSc2 der Firma IFC (Deutschland) wurden für die Experimente eingesetzt.

Die Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität, dem LacZ-Genprodukt, erfolgt in sogenannten β -Galaktosidase Assays (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

Zur Bestimmung der CAT-Enzym Aktivität in Proteinextrakten nach dem Immunassayprinzip wird beispielweise der von der Firma Boehringer (Deutschland) kommerziell erhältliche "CAT-ELISA"-Test verwendet.

Beispiele

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 1 angegebene Konfiguration dar.

- 15 1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für einen Transkriptionsfaktor codiert. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an DNA-Bereiche einer DNA (Target-Bindstelle), die für einen zweiten regulatorischen Faktor, in dieser Versuchsanordnung für einen Repressor, codiert.
- 20 2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer Bindestelle auf der DNA (Target-Bindstelle) für den unter 1 genannten Transkriptionsfaktor bereitgestellt.
- 25 3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen lacZ und/oder lacU wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor benötigen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer Transkriptionsfaktor TF) bindet, aus einer oder

mehreren Repressorkennungssequenzen, an die ein Repressor binden kann, und einer TATA-Box für die basale Transkription zusammen.

- 5 a. Wird der Versuchsanordnung kein Inhibitor zugesetzt, liegt ein aktiver Transkriptionsfaktor vor, der die Expression eines Repressorproteins positiv reguliert. Der aktive Repressor bindet an die oben genannte Repressorkennungssequenz bzw. Repressorbindstelle und reprimiert die Expression des Reportergens LacZ und/oder lacU, d.h. es findet kein Wachstum der Wirtszorganismen statt, eine Farbreaktion ist nicht nachzuweisen.
- 10 b. Nach Zugabe eines Inhibitors wird die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors, hier Transkriptionsfaktor, gehemmt. Dies ist auf eine Hemmung der Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen. Es findet keine Expression des Repressorgens statt. Somit steht kein Repressor zur Verfügung, und das dem Promotor nachgeschaltete Reportergen LacZ und/oder lacU wird durch einen induzierbaren endogenen Transkriptionsfaktor stark exprimiert. Infolgedessen wachsen die Hefen in Leucindelizienten Medien, und nach Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.
- 15 c. Die Zugabe eines Inhibitors führt also gemäß der vorliegenden Erfindung zu einer Expression des Reportergens/des Reportergens, indem der zweite regulatorische Faktor, hier Repressor, gehemmt wird.

31

32

Beispiel 2

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 2 dargestellte Konfiguration dar.

- 5 1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Hybridproteine des Transkriptionsregulators codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein Hybridprotein codiert, welches ein Fusionsprotein aus einer Bindedomäne und einer ersten Proteinkomponente ist, sowie eine weitere Anordnung für ein Hybridprotein codiert, welches ein Fusionsprotein aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist (Fig. 2a).
- 10 2. Das weitere wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA ("Target-Bindestelle") für den Transkriptionsregulator bereitgestellt.
- 15 3. Eine Reportergenanordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.
- 20 4. Der Transkriptionsregulator setzt sich, wie oben beschrieben, aus zwei Fusionsproteinen zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt (siehe Fig. 2a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsregulator ist vorhanden. Dieser aktive Transkriptionsregulator bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA ("Target-Bindestelle"), welche für das Repressorgen codiert, und bewirkt eine Expression

des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da *LacZ* und/or *LacZ* nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigen Medium statt.

- 10 b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionsproteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsregulator oder ein in seiner Aktivität verminderter Transkriptionsregulator vor, da die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und die DNA-Bindedomäne auf verschiedenen Fusionsproteinen lokalisiert sind und demzufolge bei einer Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine diese Domänen nicht oder vermindert miteinander wechselwirken können.
- 15

Die DNA-bindende Domäne des einen Fusionsproteins des Transkriptionsregulators kann, je nach Versuchsbedingung und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt binden oder nicht binden. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsregulators findet keine Expression des Repressorgens statt.

30

35

33

34

34

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf LacZ-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Weitere bevorzugte Ausführungen ergeben sich aus Abwandlungen der unter den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Ausführungsformen.

Beispiel 3

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 3 gezeigte Konfiguration.

20. 1. Eine Genanordnung, welche für einen Transkriptionsfaktor codiert, wird bereitgestellt. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an Bereiche einer DNA (Target-Bindestelle), die für eine Rekombinase codiert.
 2. Das weitere wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase das Coliphagen PI codiert.
 3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen Leu2 und/oder LacZ wird bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein
5. a. Wie bereits unter Beispiel 1 beschrieben, liegt, sofern kein Inhibitor zugesetzt wird, ein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression der Rekombinase Cre positiv. Die Rekombinase interagiert mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene LacZ/Leu2 flankieren und eliminiert oder invertiert in einem Rekombinationsprozess die genannten Reportergene.
 15. b. Nach Zugabe eines Inhibitors wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors gehemmt, wobei dies auf eine Hemmung der Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen ist. Darauf folge findet keine Expression der Rekombinase statt und die dem Promotor nachgeschalteten Reportergene LacZ und/oder Leu2 werden durch einen induzierbaren, bevorzugt endogenen Transkriptionsfaktor stark exprimiert. Die Wirtszellen, in dieser Versuchsanordnung sind es bevorzugt Hefen, wachsen nun auf LacZ-defizienten Medien und bei Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.

35

36

Die Zugabe eines Inhibitors führt also wiederum zu einer Expression von Reportergenen.

Beispiel 4

- Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 4 dargestellte Konfiguration.
1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 2 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Hybridproteine codieren, welche über eine Protein-Protein-Wechselwirkung einen aktiven Transkriptionsregulator bilden.
 2. Des Weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen PI codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.
 3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen *lacZ* und/oder *lacZ* wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält TATA-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende *lox P*-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.
 4. Wie auch unter Beispiel 2 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den den Transkriptionsfaktor bildenden Fusionproteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsfaktor vorliegt. Der aktive Transkriptionsfaktor bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase
- codierende *cre*-Gen enthält. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder invertiert über Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene, wobei sie mit den *lox P*-Sequenzen, welche die Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach einer Elimination als auch nach einer Inversion werden keine funktionellen Reportergene exprimiert. Demzufolge findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.
5. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsanansatz wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionproteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsregulator vor. Die DNA-bindende Domäne des einen Fusionproteins des Transkriptionsregulators bindet, je nach Versuchsbedingungen und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsregulators bindet kein Transkriptionsregulator an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert. Entsprechend werden die Reportergene *lacZ* und/oder *lacZ* weder eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht

wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase, gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene erst ermöglicht wird. Die Nutzung einer Rekombinase in dem vorliegenden Verfahren ermöglicht einen Inhibitornachweis nach einem "Alles-oder Nichts"-Prinzip, wobei sich, gemäß der vorliegenden Erfindung, der positive Nachweis von Reportergenen nach Inhibitorzugabe als besonders geeignet erweist und sehr empfindliche Nachweise ermöglicht.

Beispiel 1

Diese Beispiele stellen die in Fig. 5 angegebene Konfiguration dar.

- Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Proteine codieren, wobei eine Anordnung für ein Protein codiert, welches eine DNA-bindende Domäne, eine Domäne, welche an ein weiteres zweites Protein bindet, und eine aktivierende Domäne enthält, sowie eine weitere Anordnung für ein weiteres zweites Protein, welches mindestens eine mit dem ersten Protein wechselwirkende Domäne enthält (Fig. 5a).
- Des Weiteren wird eine Repressorenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsregulator bereitgestellt.

3. Eine Reportergenanordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

- Der Transkriptionsregulator setzt sich aus den beiden oben beschriebenen Proteinen zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt (siehe Fig. 5a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung (Target I - Target II) statt und ein aktiver Transkriptionsregulator liegt vor. Der aktive Transkriptionsregulator bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (Target I-Bindestelle), welche für das Repressorprotein codiert, und bewirkt eine Expression des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da LacZ und/oder Leu2 nicht exprimiert werden, findet Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.
- Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsregulator vor, da bei einer Hemmung der Wechselwirkung der Proteine der Transkriptionsregulator nicht in der aktiven Form (Konformation) vorliegt.

Die DNA-bindende Domäne des einen Proteins des Transkriptionsregulators kann, je nach Versuchsbedingung und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt binden oder nicht binden. Aufgrund der gehemten Protein-Protein-Wchselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsregulators findet keine Expression des Repressorgens statt.

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors TF, die Reportergene leu2 und/oder lacZ exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Beispiel 5

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 6 dargestellte Konfiguration.

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 5 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Proteine codieren, welche über eine Protein-Protein-Wchselwirkung einen aktiven Transkriptionsregulator bilden.

2. Des Weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des

Coliphagen PI codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.

3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen leu2 und/oder lacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

- a. Wie auch unter Beispiel 5 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungebremste Protein-Protein-Wchselwirkung zwischen den den Transkriptionsregulator bildenden Proteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt. Der aktive Transkriptionsregulator bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase codierende Cre-Gen enthält. Nach Bindung des Transkriptionsregulator wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder invertiert über Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene, wobei sie mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach einer Elimination als auch nach einer Inversion werden keine funktionellen Reportergene exprimiert. Dazu folge findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.

- b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsanansatz wird die Protein-Protein-Wchselwirkung der

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

41

proteine, z.B. über Konformationsänderung, des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsregulator vor. Die DNA-bindende Domäne des einen Proteins des Transkriptionsregulators bindet, je nach Versuchsbedingungen und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsregulators bindet kein Transkriptionsregulator an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert.

Entsprechend werden die Reportergene LacZ und/oder LacZ weder eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression des Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-Cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase, gehemmt, wodurch eine Expression des Reportergene erst ermöglicht wird. Die sich ergebenden Vorteile wurden bereits in Beispiel 4b beschrieben.

Beispiel 7

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 7 dargestellte Konfiguration dar.

42

- Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Proteine Target II und Target III codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein Protein Target III codiert, welches ein Protein aus einem verankerten Abschnitt und einer ersten Proteinkomponente ist, und eine weitere Anordnung für ein Protein Target II codiert, welches ein Fusionsprotein aus einem inhibierenden Abschnitt und einer zweiten Proteinkomponente ist (Fig. 7a).

- Es wird eine Genanordnung für einen Transkriptionsfaktor Target I bereitgestellt, der inhibiert werden kann.
- Das weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsfaktor bereitgestellt.
- Eine Repressorgenanordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.
- Eine Reportergenanordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

- Bei ungastörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine kann der inhibierende Abschnitt des ersten Proteins nicht mit dem Transkriptionsfaktor wechselwirken, somit liegt ein aktiver Transkriptionsfaktor vor (siehe Fig. 7a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsfaktor ist vorhanden. Dieser aktive Transkriptionsfaktor bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA, welche für das Repressoren codiert, und bewirkt eine Expression des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im

35

35

43

44

Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da LeuZ und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

- b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, wie z.B. die Substanzen, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Wechselwirkung der Proteine Target II und Target III gehemmt. Das Protein mit dem inhibierenden Abschnitt Target II wird freigesetzt und bindet an den Transkriptionsfaktor Target I, wodurch dieser inhibiert wird. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsfaktor vor.

- 20 Aufgrund der gehemmten Protein-protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsfaktors findet keine Expression des Repressorgens statt.
- 25 Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung einer entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors TF, die Reportergene LeuZ und/oder LacZ exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Beispiel 8

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 8 dargestellte Konfiguration.

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 7 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Proteine codieren.
2. Es wird eine Genanordnung für einen Transkriptionsfaktor bereitgestellt (Target I).
3. Des Weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen PI codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.
4. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen LeuZ und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.
 - a. Wie auch unter Beispiel 7 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den Proteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsfaktor vorliegt. Der aktive Transkriptionsfaktor Target I bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase codierende Cre-Gen enthält. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors

45

46

wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder invertiert über Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene, wobei sie mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach einer Elimination als auch nach einer Inversion werden keine funktionellen Reportergene exprimiert. Dazu folge findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.

b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsansatz wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine Target II und Target III gehemmt. Das Protein mit dem inhibierenden Abschnitt Target II wird freigesetzt und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor, wodurch dieser inhibiert wird. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors bindet, je nach Versuchbedingungen, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsfaktors bindet kein Transkriptionsfaktor an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert.

c. Entsprechend werden die Reportergene LacZ und/or LacZ weiter eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase, gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene erst ermöglicht wird.

Beispiel 3

Die Funktionsweise des Verfahrens wird am Beispiel des Tet-Repressors und dessen spezifische Inhibition durch Tetracyclin näher erläutert.

- Dieses Beispiel stellt die in Fig. 9 angegebene Konfiguration dar.
1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für den ersten regulatorischen Faktor Adl-Tet codiert. Dieser regulatorische Faktor bindet an DNA-Bereiche einer DNA (Tet-Bindungsstelle), die für den zweiten regulatorischen Faktor, den Repressor LexA-GST, codiert.
 2. Des Weiteren wird eine Repressorgenanordnung des Repressors LexA-GST mit einer Bindestelle auf der DNA (Tet-Bindestelle) für den unter 1 genannten ersten regulatorischen Faktor Adl-Tet bereitgestellt.
 3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen LacZ und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene in vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer

Transkriptionsfaktor Gal4) bindet, aus einer oder mehreren LexA Bindungsstellen, an die ein LexA-GST binden kann, und einer TATA-Box für die Initiation der basalen Transkription zusammen.

5

a. Durch die Expression des Fusionsklones ADL-Tet (erster regulatorischer Faktor) wird die Expression des Repressors LexA-GST (zweiter regulatorischer Faktor) stimuliert. Dieses

Repressorprotein wiederum reprimiert durch die Bindung an die LexA-Blinde Stelle des in Figur 9 beschriebenen LacZ bzw. LEU2-Promotors die vom ersten regulatorischen Faktor unabhängige Gal4-aktivierte Expression der Reporterogene LacZ und Leu2. Da die Gal4-aktivierte Expression der Reportergene durch Glukose inhibiert und erst auf Galaktose stimuliert wird, können diese Hefen auf Leucin-defizienten Medien nicht wachsen und bleiben auf X-Gal-haltigem Medium weiß (Tabelle 1).

10 20 15

1). Besitzt das Medium Galaktose als Zuckergquelle, bleibt der Gal4-LexA-Promotor durch die ADL-Tet abhängige Expression des LexA-GST Repressors weiter inhibiert; die Hefekolonien bleibt weiß und wachsen auf Leucin-defizienten Medien nicht.

25 b. In Abhängigkeit steigender Tetracyklin-Konzentration (Figur 9 sowie Tabelle 1 und 2) wird die Bindung des ADL-Tet-Proteins an den Tet-abhängigen Promotor des LexA-GST Repressors spezifisch inhibiert. Die hier verwendete, steigende Tetracyklin-Konzentration inhibiert das generelle Wachstum der Hefen nicht. Der zweite regulatorische Faktor ist nun nicht mehr in der Lage, die Aktivität des Reportersystems zu inhibieren. Die Hefezellen werden nun mit Galaktose als Zuckergquelle und X-

Gal als Substrat für das Reportersystem blau und können auf Leucin-defizienten Medien wachsen. Glukose-haltiges Medium dagegen inhibiert die Aktivität des endogenen Transkriptionsfaktors Gal4. Die Hefen wachsen nicht auf Leucin-defizienten Medien und bleiben auf X-Gal-haltigen Medienplatten weiß. Andere Antibiotika wie Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Carbenicillin haben keine derartig reprimierende Wirkung auf den ersten regulatorischen Faktor ADL-Tet (Tabelle 1). Auf Glukose-haltigen Platten wird Gal4 unabhängig vom ersten und zweiten regulatorischen Faktor inhibiert, weswegen auf derartigen Medien die Hefen nicht wachsen und weiß bleiben.

Tabelle 1:

Tetracyklin-Zugabe	Wachstum auf LEU-Zugabe		Blaufärbung auf X-Gal	
	Glukose	Galaktose	Glukose	Galaktose
--	--	--	weiß	weiß
++	--	++	weiß	blau

20

25

30 35

Tabelle 2: (nur die Ergebnisse der Galaktose-haltigen Platten dargestellt)

a)

Verwendetes Antibiotikum	Eingesetzte Konzentrationen [µg/ml]				
	0	5	50	250	500
Tetracyklin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	++ / blau	
Ampicillin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	
Kanamycin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	
Carbenicillin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	
Chloramphenicol	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	

Wachstum auf LEU-/ Blaufärbung auf X-Gal

5

b)

Verwendetes Antibiotikum	Eingesetzte Konzentrationen [µg/ml]						
	0	5	50	100	150	200	250
Tetracyklin	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	-- / weiß	++ / blau	++ / blau	++ / blau

Wachstum auf LEU-/ Blaufärbung auf X-Gal

10

Assay

c) Nachweis der Funktionsweise der einzelnen Elemente im Assay

- ADL-Tet als Transkriptionsfaktor:

Um nachzuweisen, daß Tetracyklin die Bindungsaktivität des ADL-Tet-Proteins spezifisch zu inhibieren vermag, wurden zusätzlich steigende Konzentrationen des Antibiotikums auf die Medienplatten gegeben:

15 ADL-Tet als Transkriptionsfaktor:

Um nachzuweisen, daß Tetracyklin die Bindungsaktivität des ADL-Tet-Proteins spezifisch zu inhibieren vermag, wurden zusätzlich steigende Konzentrationen des Antibiotikums auf die Medienplatten gegeben:

20 ADL-Tet als Transkriptionsfaktor:

Um nachzuweisen, daß Tetracyklin die Bindungsaktivität des ADL-Tet-Proteins spezifisch zu inhibieren vermag, wurden zusätzlich steigende Konzentrationen des Antibiotikums auf die Medienplatten gegeben:

Tabelle 3:

	Eingesetzte Konzentrationen Tetracyklin [µg/ml]						
	0	5	50	100	150	200	250
Blaufärbung auf X-Gel	blau	blau	blau	blau	blau	weiß	weiß
Galaktose-haltige Platten mit Leucin im Medium	++	++	++	++	++	++	++
Glukose-haltige Platten mit Leucin im Medium	++	++	++	++	++	++	++

Wie die experimentellen Daten zeigen, kann in Abhängigkeit steigender Tetracykinkonzentration (Tabelle 3) die Bindung des ADL-Tet-proteins an den

20

Auf Galaktose-haltigen Medienplatten wird ADL-Tet exprimiert und ist damit in der Lage, an die Tet-Blindstelle eines entsprechenden Promotors vor dem lacZ-Gen zu binden und von dort die Expression des Reportergenes lacZ zu aktivieren. Dieses wiederum kann durch die Umwandlung des im Medium enthaltenen, farblosen Substrats X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff nachgewiesen werden. Da Glukose die Expression des ADL-Tet-Proteins inhibiert, findet auch keine Expression des Reportergenes lacZ statt. Die Kolonien bleiben weiß.

51

52

52

Promotor des Reportergenes LacZ spezifisch inhibiert werden. Bei einer Konzentration von 200 µg/ml Tetracyclin im Medium bleiben die Hefezellen weiß. Das generelle Wachstum der Hefezellen wird dadurch nicht wesentlich beeinflußt, wie die Ergebnisse auf den Glukose- und Galaktose-haltigen Platten zeigen (das Wachstum wird durch "++" dargestellt).

- LexA-GST als Repressor

Um nachzuweisen, daß der zweite regulatorische Faktor (LexA-GST) in der Hefe funktionell exprimiert, in den Kern transportiert und dort effizient an die LexA-Konsensussequenz gebunden wird und von dort aus die Transkription eines Genes inhibieren kann, wurde der folgende Assay durchgeführt.

Im Gegensatz zur Negativkontrolle CTF2 (einem Mitglied der NFI-Familie) bleiben die Hefeklone auf X-Gal- und Galaktose-haltigem Medium weiß. Dies bedeutet, daß der LexA-GST-Fusionsprotein zwischen der Gal4-Bindestelle und dem Transkriptionsstart des Reportergens bindet und damit die Aktivität des endogenen Hefetranskriptionsfaktors Gal4 inhibiert. CTF2 dagegen ist nicht in der Lage die LexA-Bindestellen zu erkennen und kann so die Aktivität von Gal4 nicht reprimieren. Das Reportergen LacZ wird exprimiert und die Kolonien färben sich blau (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905).

Beispiel 10

Identifikation spezifischer Peptid-Inhibitoren von CTF7

Um inhibierende Peptidsequenzen gegen den in Hefe transkriptionsaktiven CTF7, einem Mitglied der NFI-

Familie (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905), zu screenen, wurde der folgende Assay (Fig. 10) durchgeführt.

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 10 angegebene Konfiguration dar.

1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für einen ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7 codiert. Das entsprechende Plasmid PEG-CTF7 enthält die Genanordnung für den ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7. Dieser erste regulatorische Faktor LexA-CTF7 bindet an DNA-Bereiche einer DNA (LexA-Bindestelle), die für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST codiert.
2. Das weiteren wird eine Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST mit einer Bindestelle auf der DNA (LexA-Bindestelle) für den unter 1 genannten ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7 bereitgestellt.
3. Eine Reportergenanordnung mit den Reportergenen lacZ und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotoren besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer Transkriptionsfaktor Gal4) bindet, aus einer Tet-Bindungsstelle, an die Tet-GST binden kann, und einer TATA-Box für die Initiation der basalen Transkription zusammen.

35 a. Wird der Versuchsanordnung kein Inhibitor zugesetzt, liegt ein aktiver erster

53

54

regulatorischer Faktor LexA-CTF7 vor, der die Expression des Tet-GST Gens positiv reguliert. Tet-GST bindet an die oben genannte Tet-GST Bindungsstelle und reprimiert die Expression des Reportergens LacZ und/oder Leu2, d.h. es findet kein Wachstum der Wirtszorganismen statt, eine Farbreaktion ist nicht nachzuweisen.

b. Nach Zugabe eines Trx-Peptids wird die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF7 gehemmt. Dies ist auf eine Hemmung der Interaktion von LexA-CTF7 mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen. Es findet keine Expression des Tet-GST-Gens statt. Somit steht kein Tet-GST zur Verfügung, und das dem Promotor nachgeschaltete Reportergen LacZ und/oder Leu2 wird durch einen induzierbaren endogenen Transkriptionsfaktor Gal4 stark exprimiert.

Infolgedessen wachsen die Hefen in Leucin-defizienten Medien, und nach Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.
Die Zugabe des Trx-Peptids führt also gemäß der vorliegenden Erfindung zu einer Expression des Reportergens/der Reportergene, indem der zweite regulatorische Faktor Tet-GST nicht bzw. verhindert reprimiert wird.

Im Detail wird der Versuch wie folgt durchgeführt:

Der Hefestamm INVScI wurde mit den in Fig. 10 dargestellten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf einer Glukose-haltigen Minimalmediumplatte (20 x 20 cm; Uracil-, 5

Tryptophan- und Histidin-defizient zur Selektion auf die Plasmide) ausgestrichen.
Der Vektor pEG-CTF7 (entspricht dem ersten regulatorischen Faktor) und wurde nach Altmann et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905) hergestellt.

pYES-Leu2/34-TetGST (Plasmid, welches den zweiten regulatorischen Faktor TetGST codiert und das Reportersystem beinhaltet).

Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pYES2. Die LexA-Bindestellen Oligos wurden in die XbaI-Schnittstelle des inaktiven Gal4/Gal40 Promotors ligiert, der gesamte Promotor mit BamHI isoliert und zusammen mit dem Fusionsktion Tet-GST in den Polylinker des Plasmides pYES2 kloniert. Der Gal4-Promotor war zuvor über die SpeI-Schnittstelle gelöscht worden. In die mit Klenow-Polymerase behandelte NheI-Schnittstelle dieses Konstruktes erfolgte die Klonierung des über BamHI isolierten, ebenfalls mit Klenow behandelten LacZ-, bzw. des über PCR erhaltenen Leu2-Fragments. In die dabei rekonstituierte BamHI-Schnittstelle erfolgte die Ligation des Gal4/Tet-Promotors. Dieser wurde durch die Klonierung von Tet-Oligos und die anschließende Ligation von Gal4-Bindestellen in die XbaI-Schnittstelle des inaktiven Gal4/10-Promotors erhalten.

pYES(Trl1)Trx-Oligo-Pool (Peptid-Pool exprimierendes Konstrukt; Komplexität ca. 105)

Durch die Ligation des Trl1-Gens in den mit Apal und NheI linearisierten pYES2-Vektor, wurde das

5

10

15

20

25

30

35

55

56

Tabelle 4:

Identifizierte Inhibitoren	Wachstum auf Leuchttabellenplatten		Blaufärbung auf X-Gal-haltigen Platten		Inhibition von LexA-TAL auf Galaktose
	Glukose	Galaktose	Glukose	Galaktose	
A	+	-	+	-	
B	+	+	+	+	n.b.
C	+	+	+	+	n.b.
D	+	-	+	+	+
E	+	-	+	-	-
F	+	-	+	-	-
G	+	-	+	-	
H	+	-	+	+	+

Ura3-Gen zerstört und das Plasmid auf Tryptophandefizienz selektierbar. Anschließend wurde das über PCR isolierte Trx-Gen in den EcoRI, Khol linearisierten Vektor kloniert. Die Ligation der Pool-Fragmente erfolgte über die RerII-Schnittstelle des Trx-Konstruktes.

Die ca. 30.000 Kolonien wurden vereinigt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgetrichen.

Die Selektionsplatten basaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren Leucin-, Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen waren 8 Kolonien (A, B, C, D, E, F, G, H) gewachsen (Tabelle 4). Aus diesen wurden 15 zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit CTF7 und Tet-GST in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt des leu2 das lacZ-Gen auf dem Reporterplasmid, sodaß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 4).

Daneben wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (lacZ und leu2) und einem von CTF7 verschiedenen Transkriptionsfaktor LexA-TAL in Hefen transformiert. Auf diese Weise können CTF7 spezifisch inhibierende Peptide von unspezifischen Inhibitionen unterschieden werden.

Die ca. 30.000 Kolonien wurden vereinigt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgetrichen.

Die Selektionsplatten basaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren Leucin-, Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen waren 8 Kolonien (A, B, C, D, E, F, G, H) gewachsen (Tabelle 4). Aus diesen wurden 15 zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit CTF7 und Tet-GST in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt des leu2 das lacZ-Gen auf dem Reporterplasmid, sodaß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 4).

Daneben wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (lacZ und leu2) und einem von CTF7 verschiedenen Transkriptionsfaktor LexA-TAL in Hefen transformiert. Auf diese Weise können CTF7 spezifisch inhibierende Peptide von unspezifischen Inhibitionen unterschieden werden.

Die Inhibitoren B und C färbten sich auch auf Glukose-haltigen Platten, also unabhängig von der Galaktose-induzierten TRX-Peptidexpression, blau. Dies bedeutet, daß in den entsprechenden Klonen keine inhibierenden Peptide exprimiert werden, welche die Blaufärbung verursachen. Von den Peptiden A, D, E, F, G und H stellten sich D und H als unspezifisch heraus, da sie auch in der Lage waren die LexA-TAL-Domäne zu inhibieren. Die Inhibitoren A, E, F und G dagegen waren nur in der Lage die Aktivität von CTF7 zu reprimieren (n.b.: nicht bestimmt).

Beispiel II

Identifikation spezifischer Inhibitoren der Protein-Protein-Wechselwirkung LexA-CTF2/AD1-TIM

Der in Fig. 11 beschriebene Assay wird durchgeführt, um inhibierende Peptidsequenzen gegen die in Hefe aktive Protein-Protein-Interaktion LexA-CTF2 und TIM-AD (Altmann (1994), Dissertation) zu screenen. LexA-CTF2 ist ein Fusionsskonstrukt aus dem bakteriellen Repressor LexA und CTF2, einem Mitglied der NFI-Familie. Hierzu wird der Hefestamm INVSc1 mit den in Fig. 11 dargestellten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf einer Glukose-haltigen Minimalmediumplatte (20 x 20 cm; Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient zur Selektion auf die Plasmide) ausgestrichen.

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 11 dargestellte Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Hybridproteine des Transkriptionsregulators codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-box enthalten, wobei eine Anordnung für ein LexA-CTF2, einem Fusionsskonstrukt aus dem bakteriellen Repressor LexA und CTF2, einem Mitglied der NFI-Familie (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905) codiert, sowie eine weitere Anordnung für ein Hybridprotein TIM-AD (Altmann (1994), Dissertation).
 2. pSH-CTF2/TIM (entspricht dem ersten regulatorischen Faktor) ist das entsprechende Plasmid, welches den ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF2/AD1-TIM codiert.
 3. pYES2(TRP1)TRX-Oligo-Pool (Peptid-Pool exprimierendes Konstrukt; Komplexität ca. 10⁵).
- a. Der erste regulatorische Faktor LexA-CTF2/AD1-TIM setzt sich, wie oben beschrieben, aus zwei Fusionssproteinen LexA-CTF2 und AD1-TIM zusammen, wobei nur bei ungünstiger Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Fusionssproteine ein aktiver erster regulatorischer Faktor pSH-CTF2/TIM vorliegt (siehe Fig. 1a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungebundete Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsregulator ist vorhanden. Der aktive Transkriptionsregulator LexA-CTF2/AD1-TIM bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (LexA-Bindestelle), welche für das Tet-GST Gen codiert, und bewirkt eine Expression von Tet-GST. Tet-GST bindet an die entsprechende Bindestelle (Tet-GST Bindestelle) im Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reproterogene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium noch eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.
- b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. ein Tri-Peptid, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionssproteine LexA-CTF2 und AD1-TIM gehemmt. Es liegt nun kein aktiver erster regulatorischer Faktor vor.
- Aufgrund des inaktiven ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2/AD1-TIM findet keine Expression des Tet-GST Gens (Repressor-Gen) statt. Da kein Repressor Tet-GST vorliegt, werden, nach Bindung

59

WO 952052

60

eines weiteren Transkriptionsfaktors Gal4, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ exprimiert.

Tabelle 5:

Identifizierte Inhibitoren	Blauführung auf X-Gal-haltigen Platten		Inhibition von Leu2-TAI auf Galaktose
	Wachstum auf Leucin-dezitenten Platten	Glukose	
A	+	+	+
B	+	-	+
C	+	+	+
D	+	-	+
E	+	-	+
F	+	-	-

5 Im Detail wird der Versuch, wie folgt, durchgeführt:
 Die ca. 35.000 Kolonien wurden eingesammelt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten besaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren Leucin-, Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen sind 6 Kolonien (A, B, C, D, E, F) gewachsen. Aus diesen wurden zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit Leu2-CFP2, TIM-AD und Tet-GR in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt des Leu2 das LacZ-Gen auf dem Reporterplasmid, so daß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 5). Des weiteren wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (lacZ und Leu2) und dem Transkriptionsfaktor Leu2-TAI in Hefen transformiert. Auf diese Weise konnten die TIM-CFP2 Interaktion spezifisch inhibierende Peptide von Unspezifischen abgetrennt werden.

15 In den dargestellten Versuchen 1 bis 11 ergeben sich bei verschiedenen Inhibitoren qualitative und/oder quantitative Unterschiede bezüglich der inhibitorischen Aktivität, d.h. neben einer vollständigen Hemmung der ersten regulatorischen Faktors sind auch graduelle Abschwächungen der Aktivität des ersten regulatorischen Faktors möglich. Entsprechend sind bei der Expression der Reportergene neben der vollständigen Expression auch graduelle Verstärkungen möglich und nachweisbar.

Patentansprüche

- 1.** Verfahren zur Bestimmung der Aktivität mindestens eines ersten regulatorischen Faktors, welche über die Aktivität mindestens eines Reportersystems nachweisbar ist, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- 10**
 - a.** Bereitstellen mindestens eines Reportersystems mit mindestens einer ersten Genaordnung, welche mindestens ein Reportergen aufweist,
 - b.** Bereitstellen mindestens einer zweiten Genaordnung, die für mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor codiert, und Wechselwirkung des zweiten regulatorischen Faktors mit Komponenten des Reportersystems, wodurch auf die Aktivität des Reportersystems eingewirkt wird,
 - c.** Einwirkung vorzugsweise auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors durch den mindestens einen ersten regulatorischen Faktor, und
 - 15**
 - 15** **5.** Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die eine oder mehrere regulierende Komponenten ein oder mehrere regulierende Proteine sind.
 - 6.** Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das regulierende Protein oder die regulierenden Proteine ein oder mehrere Transkriptionsregulatoren bind.
 - 20**
 - 20** **7.** Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsregulator oder die Transkriptionsregulatoren ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren sind.
 - 25**
 - 25** **8.** Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das regulierende Protein oder die regulierenden Proteine den mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor modifizieren.
 - 30**
 - 30** **9.** Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation des mindestens einen zweiten regulatorischen Faktors durch Kinasierung, Deposphorylierung, Spaltung, Umfälgung oder Konformationsänderung erfolgt.
 - 35**
 - 35** auf die Expression des zweiten regulatorischen Faktors eingewirkt wird.

63

64

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten, welche gemeinsam den ersten regulatorischen Faktor bilden, und/oder auf die Aktivität des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors eingewirkt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens einem ersten regulatorischen Faktor und einem DNA-Abschnitt der mindestens einen zweiten Genanordnung eingewirkt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Beeinflussung der genannten Aktivität des ersten regulatorischen Faktors durch inhibitorische Komponenten zu einer Einwirkung auf die Genexpression der zweiten Genanordnung führt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Inhibitor über eine Hemmung der Aktivität des regulierenden Proteins zu einer Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung führt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten eingewirkt wird, wobei die mindestens eine eritiä Komponente eine regulatorische Komponente ist oder enthält.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Komponente eine Proteininkomponente ist oder enthält.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste Proteininkomponente ein Fusionsprotein ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Komponente eine inhibitorische Komponente ist oder enthält.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Komponente mindestens eine Proteininkomponente ist oder enthält.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Proteininkomponente mindestens ein Fusionsprotein ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Komponente eine Verankerungsfunktion besitzt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Wechselwirkung der mindestens zwei Proteininkomponenten diese Proteininkomponenten im Cytoplasma lokalisiert sind.
22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Wechselwirkung der mindestens zwei Proteininkomponenten diese Proteininkomponenten an oder in einer Membran lokalisiert sind.

35

35

65

66

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Zugabe einer inhibitorischen Komponente über eine Hemmung der Wechselwirkung zwischen den mindestens zwei Komponenten die mindestens eine erste Komponente, welche den inhibitorisch wirkenden Abschnitt enthält, freigesetzt wird und mit dem transkriptionsaktivierenden Faktor der Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor interagiert.
- 10 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der transkriptionsaktivierende Faktor durch den freigesetzten inhibitorisch wirkenden Faktor gehemmt wird, wodurch eine Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung erfolgt.
- 15 25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtszorganismen Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, oder eukaryotische Zellen, vorzugsweise Hefen, eingesetzt werden.
- 20 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Bakterienstamm *Escherichia coli* oder der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wird.
- 25 27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Genprodukt des mindestens einen Reportergens nachweisbar ist.
- 30 28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis des Genproduktes durch eine oder mehrere Veränderungen des Phänotyps des Wirtszorganismus erfolgt.
- 35 29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens eine Genprodukt des Reportergens Zellwachstum der Wirtszorganismen in Mangelmedium ermöglicht.
- 5 30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt des Reportergens LacZ ist und Zellwachstum in Leucin-defizientem Medium ermöglicht.
- 10 31. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt des Reportergens LacZ Substrate in einer mebbaren Farbreaktion umsetzen kann.
- 15 32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Genanordnungen auf verschiedenen Vektoren angeordnet sind.
- 20 33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Genanordnungen auf demselben Vektor angeordnet sind.
- 25 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektoren Plasmide sind.
- 30 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Genanordnungen ins Wirtsgenom integriert sind.
35. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Genanordnung für mindestens einen Repressor codiert.

67

68

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Repressor auf die Expression des mindestens einen Reportergens einwirkt.
- 5 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, daß der Repressor durch Bindung an Komponenten des Reportersystems einwirkt.
- 10 39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des Repressors an Komponenten des Reportersystems durch weitere Agenzien reguliert werden kann.
- 15 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß in ein Reporterplasmid eine LacZ-Leu2-Genanordnung und die Repressor-Genanordnung integriert sind.
- 20 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Genanordnung für mindestens eine Rekombinase codiert und die Reportersysteme Rekombinationselemente enthalten.
- 25 42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekombinase über Rekombinationsprozesse mindestens ein Reportergen eliminiert oder invertiert.
- 30 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 oder 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekombinase die sequenzspezifische Rekombinase Cro des Coliphagen Pl ist und das mindestens eine Reportergen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente aufweist.
- 35 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13 und 25 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß der
- 5 45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß ein erstes Hybridprotein ein Fusionsprotein aus einer DNA-Bindeddomäne und einer ersten Proteinkomponente und ein zweites Hybridprotein ein Fusionsprodukt aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist, wobei durch Bindung zwischen den beiden Proteinkomponenten der aktive Transkriptionsregulator entsteht.
- 10 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einwirkung auf die Wechselwirkung der Hybridproteine über inhibitorische Komponenten erfolgt.
- 15 47. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens zwei Proteinkomponenten von einer fünften Genanordnung codiert werden.
- 20 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente einen Abschnitt, der mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente wechselwirkt, einen Abschnitt, der mit einem Transkriptionsfaktor wechselwirkt sowie einen inhibitorischen Abschnitt enthält, wobei erst nach Hammung der Wechselwirkung der Bindung zwischen den mindestens zwei Proteinkomponenten die inhibitorisch wirkende erste Proteinkomponente die Expression des mindestens einen zweiten regulatorischen Faktors hemmt.

59

70

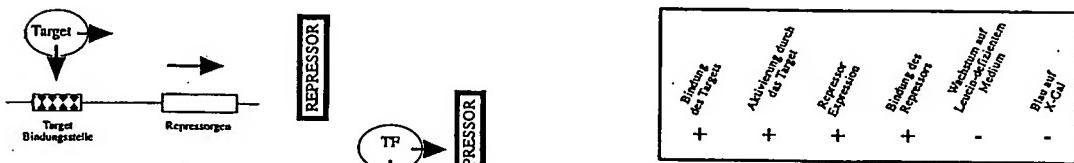
49. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste regulatorische Komponente ein Transkriptionsregulator oder Transkriptionsfaktor der Genanordnung des zweiten regulatorischen Faktors ist, der nach Inhibition der Wechselwirkung mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente in seiner Aktivität reduziert oder inaktiviert wird, wodurch die Expression des zweiten regulatorischen Faktors gehemmt wird.
50. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß diese inhibitorischen Komponenten Naturstoffe wie Peptide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen sind.
51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibitorischen Komponenten durch Mutation, veränderte Bestandteile des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors sind.
52. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine weitere vierte Genanordnung für die Expression von Peptiden bereitgestellt wird.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46 und 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression des Repressor-Gens gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
55. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46 und 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.
56. Verfahren nach Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression der Rekombinase gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
57. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24 und 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
58. Verfahren nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression des Repressor-Gens gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
59. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24 und 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß durch die

71

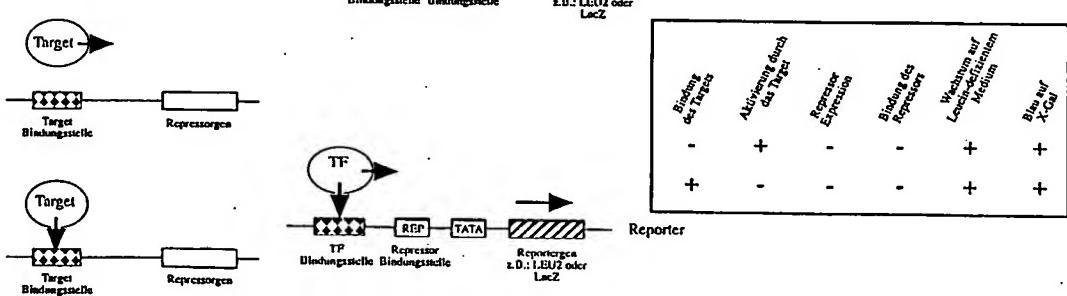
- Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten, die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 59, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression der Rekombinase gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 bis 60, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Wirtsorganismus gleichzeitig Genanordnungen für mindestens einen Repressor und mindestens eine Rekombinase bereitgestellt werden.
62. Verfahren nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, daß je nach eingestellten Versuchsbedingungen der Repressor oder die Rekombinase oder beide exprimiert werden.
20. Verfahren eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 62 zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die bevorzugt als Leitsstrukturen einsetzbar sind.
63. Verwendung eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 62 zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die bevorzugt als Leitsstrukturen einsetzbar sind.
25. Verwendung nach Anspruch 63, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierenden Substanzen Peptide sind.
30. Verwendung nach einem der Ansprüche 63 oder 64, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierenden Substanzen und Peptide zur Entwicklung von Therapeutika eingesetzt werden.

Transkriptionsstimulierende Targets im Repressor-abhängigen Verfahren

Figur 1a

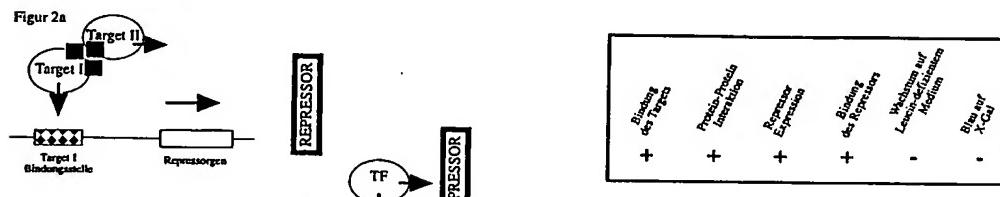


Figur 1b

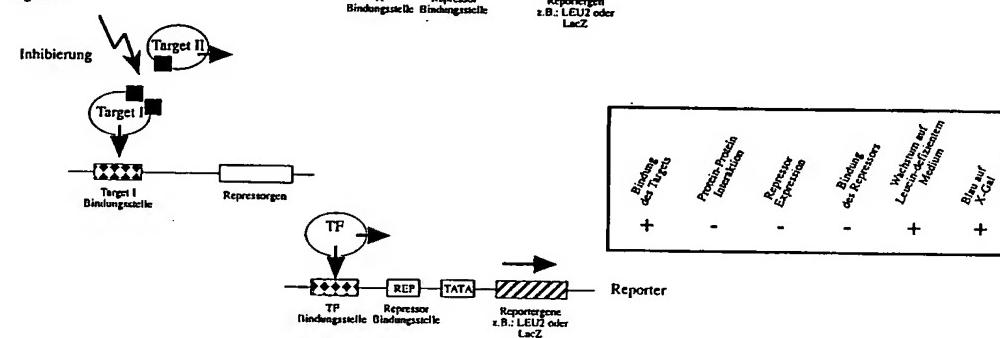


Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor abhängigen Verfahren

Figur 2a

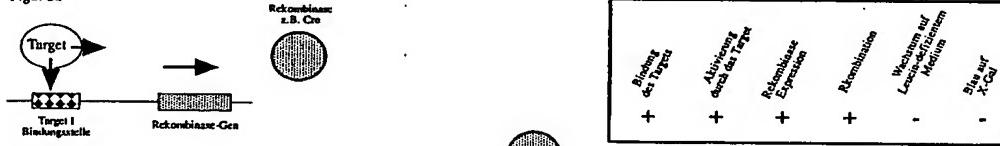


Figur 2b

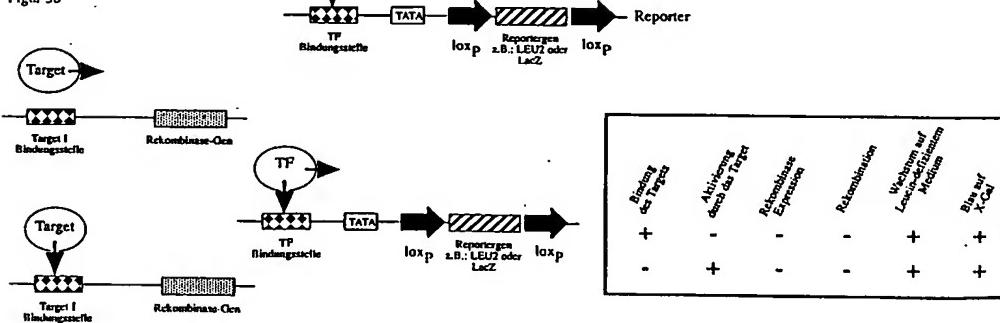


Transkriptionsstimulierende Targets im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figur 3a



Figur 3b



Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figure 4a

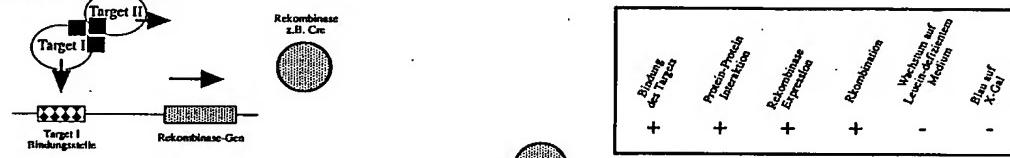
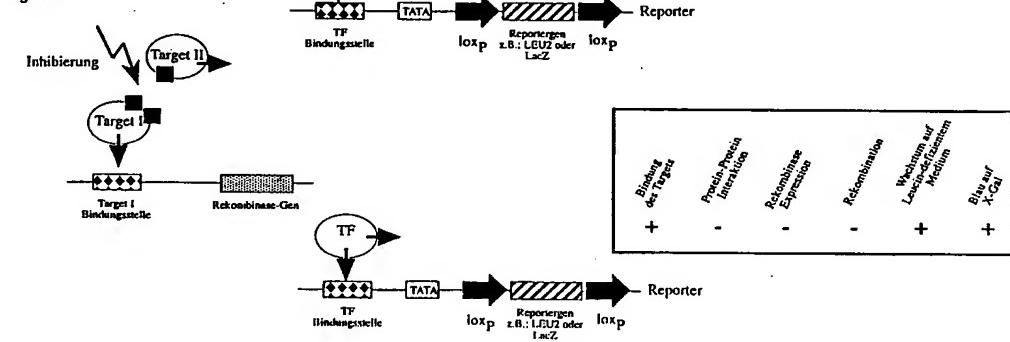


Figure 4b



Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor-abhängigen Verfahren

Figure 5a

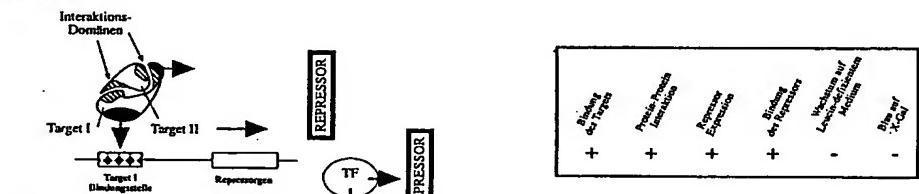
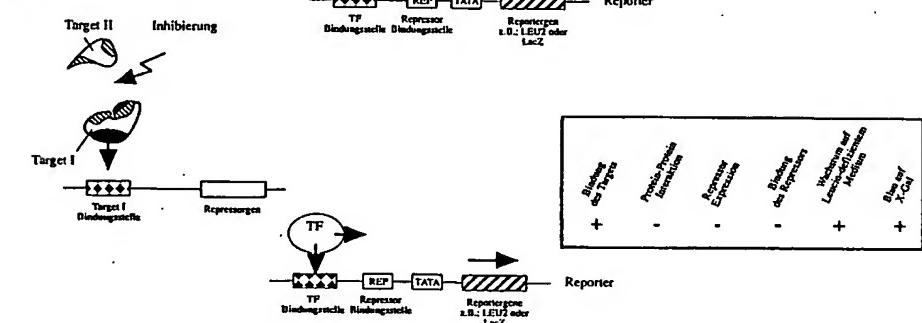


Figure 5b



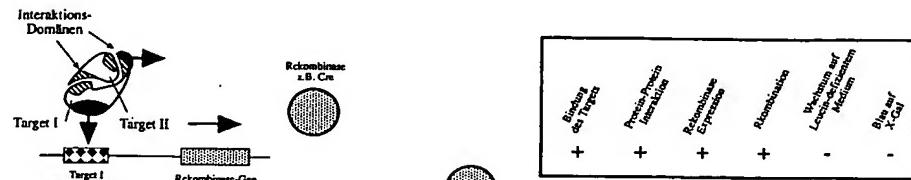
Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

W0 9527652

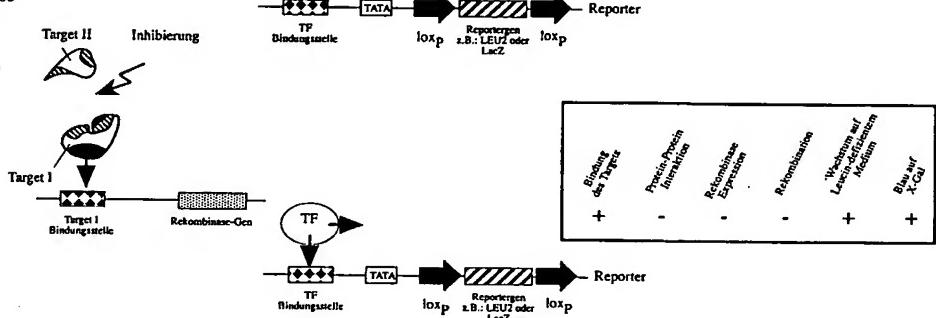
6/1

PCT/EP95/00097

Figur 6a



Figur 6b



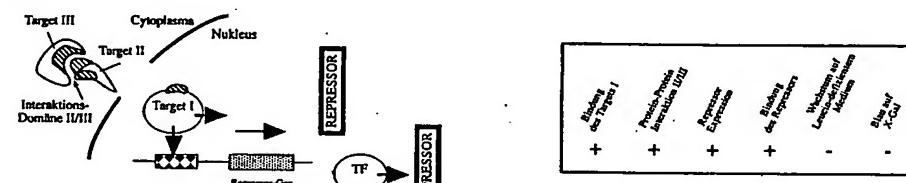
Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor-abhängigen Verfahren

W0 9527652

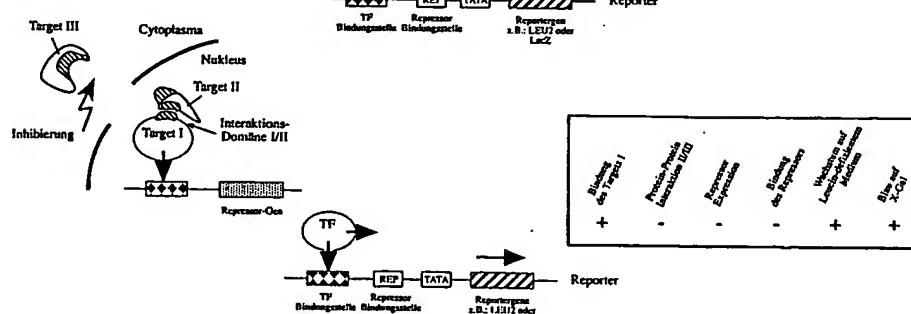
7/1

PCT/EP95/00097

Figur 7a



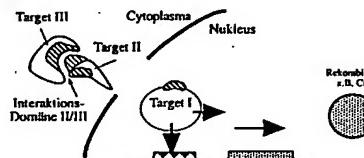
Figur 7b



8/11

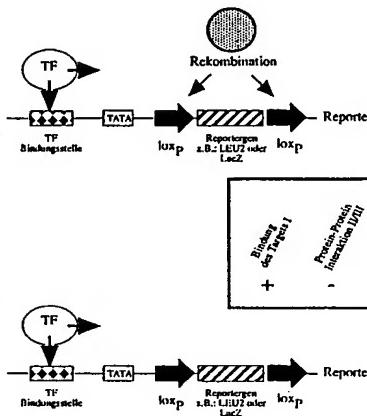
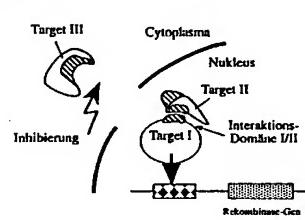
Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figur 8a



	Bildung des Target I	Proteino-Proteino-Interaktion U7	Rekombination Expressio	Rekombination	Wechselwirkung auf Leuchtdioden Medium	Blau auf X-Gal
	+	+	+	+	-	-

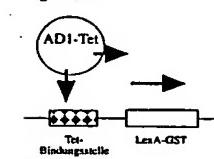
Figur 8b



	Bildung des Target I	Proteino-Proteino-Interaktion U7	Rekombination Expressio	Rekombination	Wechselwirkung auf Leuchtdioden Medium	Blau auf X-Gal
	+	+	-	-	+	+

Repression des transkriptionsstimulierenden Targets AD1-Tet im Repressor-abhängigen Verfahren

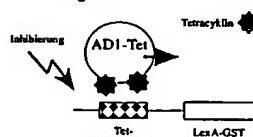
Figur 9a



LexA-GST

	Tetressis	Bildung von AD1-Tet	Aktivierung durch AD1-Tet	LexA-GST Expressio	Bildung von LexA-GST	Wechselwirkung auf Leuchtdioden Medium	Blau auf X-Gal
	-	+	+	+	+	-	-

Figur 9b



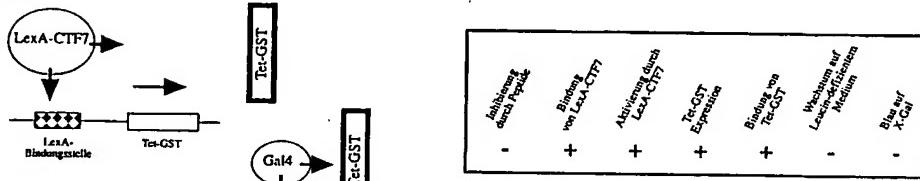
LexA-GST

	Tetressis	Bildung von AD1-Tet	Aktivierung durch AD1-Tet	LexA-GST Expressio	Bildung von LexA-GST	Wechselwirkung auf Leuchtdioden Medium	Blau auf X-Gal
	+	-	+	-	-	+	+

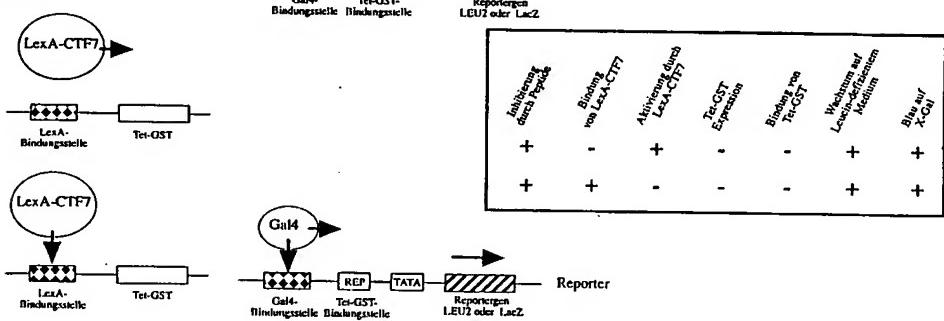
Repression des transkriptionsstimulierenden Targets LexA-CTF7 im Repressor-abhängigen Verfahren

W0952052

Figur 10a



Figur 10b



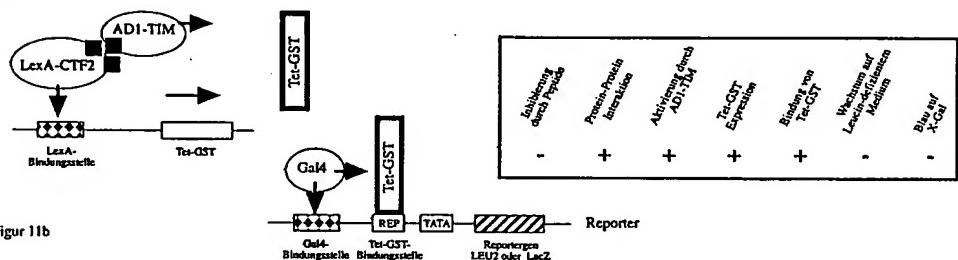
10/11

PTC/PES/00297

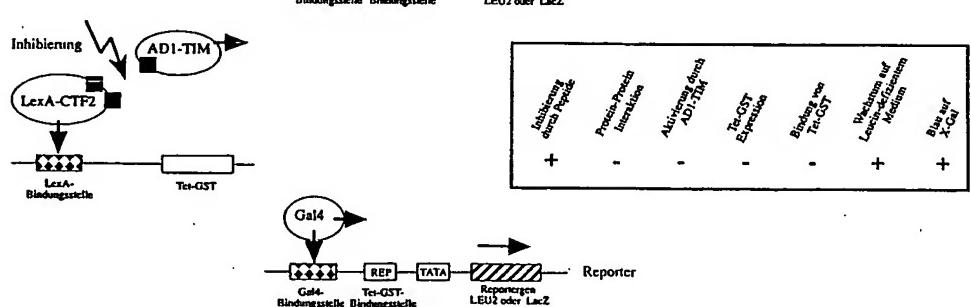
Repression der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen LexA-CTF2 und AD1-TIM im Repressor-abhängigen Verfahren

W0952052

Figur 11a



Figur 11b



11/11

PTC/PES/00297

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International & Patent No.
PCT/EP 95/00237INTERNATIONAL SEARCH REPORT
International & Patent No.
PCT/EP 95/00237

IPC 6 C12N15/70 - C12N15/67 C12N15/70 C12N15/81 C12N15/68	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)	
IPC 6 C12N C12Q	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
X	Category: Clause of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage
X	PROC. NATL ACADE SCI., VOL. 89, NO. 12, 15 JUNE 1992 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON DC, US;
X	pages 5547-5551, N. GOSSEN AND H. BULJARD 'Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters' see page 5548, right column, paragraph 4 -
Y	page 5551, left column, paragraph 2 ---
X	Reference to claim No.
X	1-5, 10-14, 25-27
Y	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	Parent documents are listed in the continuations of text C.
X	<input checked="" type="checkbox"/> Parent family members are listed in annex.
Special categories of cited documents:	
"A" document which is not considered to be of particular relevance to the application but cited to support the principle or theory underlying the invention	
"B" earlier document not published on or after the international filing date	
"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or otherwise assist in establishing the true state of the art	
"D" document which is cited to establish the publication date of another document or other special reasons (specify)	
"E" document setting out an order of disclosure, use, exhibition or other means of public availability of the document before its international filing date but later than the priority date claimed	
"F" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	
19 June 1995	
Date of mailing of the international search report	
19 June 1995	
Name and mailing address of the DPA European Patent Office, P.O. BOX 8040 D-8032 MUNICH 80, FRG Tel. (+49 89) 2399-3202, Telex 31 651 epo m.	
Authorized officer Hornig, H	

Form PCT/ISA/27 (version May 1992)

Seite 1 von 4

C (continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Clause of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage
X	THE PLANT JOURNAL, vol. 2, no. 3, 1992 BLACKWELL, OXFORD, UK, pages 397-404, C. GALT ET AL. 'Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants' see page 351, right column, line 36 - page 402, right column, paragraph 2
X	---
X	MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 227, no. 2, June 1991 SPRINGER INTERNATIONAL, ASTEROM, NL, pages 229-237, C. GALT ET AL. 'Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the TdD-encoded Tet repressor in transgenic tobacco' the whole document
Y	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	WO-A-91 16429 (GEN HOSPITAL CORP) 31 October 1991, see page 6, line 27 - page 26, line 2 the whole document
Y	1-5, 50
X	---
Y	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	WO-A-92 05286 (BRENT ROGER; GOLEMIS ERICA (US); LECH KAREN F (US); ANDERSON CATHERINE) 2 April 1992, cited in the application
Y	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
1	

Seite 2 von 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International A
PCT/EP 95/00297

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International A
PCT/EP 95/00297

C(Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI., VOL. 86, NO. 14, July 1989 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON DC, US; , pages 5473-5477 C.W. BYRNE AND F.H. RIDDLE 'Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI., VOL. 88, NO. 21, 1 November 1991 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON DC, US; , pages 9578-9582 C.-T. CHIEN ET AL. 'The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	SCIENCE, VOL. 257, 31 July 1992 AAAS WASHINGTON DC, US; , pages 660-662, X. YANG ET AL. 'A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	WO-A-93 10250 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27 May 1993	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
A	see page 5, line 1 - page 15, line 18 see page 26, line 16 - page 57, line 19 see claims 16-19	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
A	B10L CHEM HOPPE-SEYLER 373 (9). 1992. 857. CODEN: BCSNET ISSN: 0177-3593. ALTMANN H ET AL. 'Nuclear factor I a DNA-binding protein that can act as a transcriptional activator in yeast' Autumn meeting of the gesellschaft für biologische chemie (german society for biological chemistry), Rostock, Germany, September 24-26, 1992;	1-4, 25-27
Y	see page 5, line 22 - page 9, line 30; claims 15-35	---
Y	WO-A-93 15227 (UNIV DUKE) 5 August 1993	---

C(Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
P,X	WO-A-94 04672 (ONK CORP ; BYRNE GUERARD (US)) 3 March 1994 the whole document	1-5, 10, 11, 14-17, 25-28
P,X	WO-A-94 09133 (GEN HOSPITAL CORP) 28 April 1994	1-5, 10-19, 23, 25-28, 34, 36-39, 50
P,X	see page 5, line 8 - page 26, line 19; claims 1-14	---
P,X	WO-A-94 23442 (BASF AG ; RUDJARD HERMANN (DE); GOSEN MANFRED (DE); SALFFELD JOCHEN) 22 December 1994 the whole document	1-5, 10-14, 31-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International A	Action No
PCT/EP 95/00297	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116429	31-10-91	AU-A- 7676591 AU-A- 0528827 US-A- 5322801	11-11-91 03-03-93 21-06-94
-----	-----	-----	-----
WO-A-9116456	31-10-91	AU-A- 7667191	11-11-91
-----	-----	-----	-----
WO-A-9205296	02-04-92	AU-B- 650677 AU-A- 8627291 CA-A- 2022000 CH-A- 1065092 CZ-A- 9300496 EP-A- 0500592 HU-A- 66827 JP-T- 6503713 ZA-A- 9107616	30-05-94 15-04-92 25-03-92 07-10-92 15-02-94 14-07-93 30-01-95 28-04-94 24-09-93
-----	-----	-----	-----
WO-A-9310250	27-05-93	CA-A- 2123906 EP-A- 0514491	27-05-93 14-09-94
-----	-----	-----	-----
WO-A-9315227	05-08-93	AU-B- 3609693	01-09-93
-----	-----	-----	-----
WO-A-9404672	03-03-94	AU-B- 5099393 CA-A- 213326	15-03-94 03-13-94
-----	-----	-----	-----
WO-A-9409133	28-04-94	US-T- 5322801 AU-B- 5353594	21-06-94 09-05-94
-----	-----	-----	-----
WO-A-9429442	22-12-94	AU-B- 7108194	03-01-95
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Anmeldung	Anmeldung
PCT/EP 95/00297	PCT/EP 95/00297

KLASSEIFIZIERTER ANMELDUNGSGEGENSTANDES	C12N15/00
C12N15/67	C12N15/70
C12N15/81	C12N16/68
-----	-----

Nach der internationalen Patentanmeldung (IPK) oder nach der nationalen Klammern und der IPK.

B. RECHERCHEIERTE GLEICHENIE

Notwendige Methoden (Kunststoffverarbeitung und Kunststoffverarbeitungsprodukte)

IKR 6

C12N C12Q

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

Während der internationale Recherche konzentrierte sich meine Dienstbank auf mit verwandten Sachgründen:

Recherches über seit zum Antrag geöffnete Veröffentlichungen, sowie über die rechercierten Gebiete folgt:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

INTERNAZIONALE RECHERCHENBERICHT

C.I.F Formular	ALS WESENTLICH ANGEBEHENDE UNTERLAGEN Bedeutung der Veröffentlichung, soweit erforderlich und Angabe der im Bezug kommenden Teile	Der Antragsteller Nr.
Kategorie		
Y	PROC. NATL. ACADE SCI., '14 JULY 1989 NATL. ACADE SCI., WASHINGTON, DC, US,, Seiten 5473-5477, G.W. BYRNE AND F.H. RIDDLE 'Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	PROC. NATL. ACADE SCI., '21 NOVEMBER 1991 NATL. ACADE SCI., WASHINGTON, DC, US,, Seiten 9578-9582, C.-T. CHIEN ET AL. 'The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest,' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	SCIENCE, '25 JULY 1992 ADAMS, WASHINGTON, DC, US,, Seiten 680-682, X. YANG ET AL. 'A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system,' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	WO-A-93 10250 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27.Mai 1993	
Y	siehe Seite 11, Zeile 1 - Seite 15, Zeile 18 siehe Seite 26, Zeile 16 - Seite 57, Zeile 19 siehe Ansprüche 16-19	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	WO-A-93 15227 (UNIV DUKE) 5.August 1993	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
siehe Seite 5, Zeile 22 - Seite 9, Zeile 30; Ansprüche 15-35	---	-/-

